

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
MÜKOLOOGIA ÕPPETOOL

Riho Remmelgas

Metsakultuuride kahjurputukad kui seenpatogeenide levitajad

Magistritöö geenitehnoloogia erialal

Maht 30 EAP

Juhendajad vanemteadur Leho Tedersoo

dotsent Rein Drenkhan

Tartu 2016

Metsakultuuride kahjurputukad kui seenpatogeenide levitajad. Varem tehtud teadustöodes on leitud, et erinevat liiki üraseklased (*Scolydinae*) levitavad mitmeid olulisi puittaimede seenpatogeene. Tunduvalt vähem on seenpatogeenide levitajatena uuritud männikärsakaid (*Hylobius* sp.). Kasutades kaasaegseid bioinformaatilisi meetodeid, määrati seenekooslused nii putukkahjurite kui ka puittaimede proovidest. Seenekooslused määrati seente rDNA ITS2 järjestuste alusel. Töö tulemusena määrati kahjurputukate proovidest puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene nagu *Ophiostoma* sp., *Ceratocystis* sp. ja *Pesotum* sp., juuremädanikku põhjustavaid külmaseeni (*Armillaria* sp.) ja juurepessu (*Heterobasidion* spp.), ning taimede seenpatogeene nagu *Neonectria* sp., *Phoma herbarium*, *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* ja *Phaeoacremonium hungaricum*.

Märksõnad Männikärsakad; Üraseklased; Okaspuutaimed; ITS2 järjestused; Illumina MiSeq sekvenaator; Bioinformaatiline töötlus; *Ophiostoma* sp.; *Ceratocystis* sp.; *Armillaria* sp.; *Heterobasidion* spp.

B110- Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetria; **B230-** Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; **B250-** Entomoloogia, taimede parasitoloogia.

Pathogenic fungi spreaded by dangerous forest plantation pests. Previous research has revealed that beetles (*Scolydinae*) spread many important ligneous pathogens. Very little is known about these pathogens in weevils (*Hylobius* sp.). Fungal species were identified from insects and ligneous samples using modern bioinformatical methods. Fungal rDNA ITS2 sequences were used to identify fungal species. Analysis revealed that most important fungal pathogens associated with insects were sapstain fungi *Ceratocystis* sp., *Ophiostoma* sp. and *Pesotum* sp., root rot pathogens *Armillaria* sp. and *Heterobasidion* spp., and plant pathogens *Neonectria* sp., *Phoma herbarium*, *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* and *Phaeoacremonium hungaricum*.

Keywords Weevils; Beetles; Conifers; ITS2 sequences; Illumina MiSeq sequencer; Bioinformatical processing; *Ophiostoma* sp.; *Ceratocystis* sp.; *Armillaria* sp.; *Heterobasidion* spp.

B110- Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics; **B230-** Microbiology, bacteriology, virology, mycology; **B250-** Entomology, plant parasitology.

SISUKORD

| | |
|--|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| 1. SISSEJUHATUS | 5 |
| 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 6 |
| 2.1. Männikärsakad (<i>Hylobius</i> spp.) | 6 |
| 2.2. Männikärsakad ja seenpatogeenid | 8 |
| 2.3. Ürasklased (<i>Scolytinae</i>) | 8 |
| 2.4. Ürasklased ja seenpatogeenid | 9 |
| 2.5. Seenpatogeenide tuvastamine | 10 |
| 3. MATERJALID JA MEETODID | 13 |
| 3.1. Putukaproovid | 13 |
| 3.1.1. Männikärsakate proovid | 13 |
| 3.1.2. Ürasklaste proovid | 14 |
| 3.2. Taimse materjali proovid | 15 |
| 3.2.1. Okaspuu taimeproovid | 15 |
| 3.2.2. Okaspuu kannuproovid | 15 |
| 3.3. PCR amplifikatsioon ja geelelektroforees | 16 |
| 3.4. DNA puhastamine | 17 |
| 3.5. DNA sekveneerimine ja järjestuste bioinformaatiline analüüs | 18 |
| 3.6. Tulemuste statistiline analüüs | 19 |
| 4. TULEMUSED | 20 |
| 4.1. Üldised tulemused | 20 |
| 4.1.1. Bioinformaatilise töötamise tulemused | 20 |
| 4.1.2. Seentaksonite üldised tulemused | 21 |
| 4.2. Kahjurputukate proovides esinevad seentaksonid | 25 |
| 4.2.1. Männikärsakate proovides esinevad seentaksonid | 27 |
| 4.2.2. Ürasklaste proovides esinevad seentaksonid | 28 |
| 4.3. Puiduproovides esinevad seenpatogeenid | 30 |
| 4.4. Seenpatogeenid kahjurputukatel ja puittaimedel | 31 |
| 4.5. Seentaksonite esinemissagedused proovide lõikes | 32 |
| 5. ARUTELU | 34 |
| KOKKUVÕTE | 39 |
| SUMMARY | 40 |

| | |
|--|----|
| TÄNUAVALDUS | 41 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 42 |
| LISAD..... | 51 |
| Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks | 57 |

KASUTATUD LÜHENDID

OTU- Operatiivne taksonoomiline üksus (Operational taxonomic unit)

ITS1- Sisemine transkripteeritav speisser 1 (Internal transcribed spacer 1)

ITS2- Sisemine transkripteeritav speisser 2 (Internal transcribed spacer 2)

SSU- Ribosoomi väike subühik (Small subunit)

LSU- Ribosoomi suur subühik (Large subunit)

INSD- Rahvusvaheline nukleotiidsete järjestuste andmebaas (International nucleotide sequence database)

SNP- Üksiku nukleotiidi polümorfism (Single nucleotide polymorfism)

PCR- Polümeraasi ahelreaktsioon (Polymerase chain reaction)

RT-PCR- Reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (Real-time polymerase chain reaction)

HMM- Peidetud Markovi mudel (Hidden Markov model)

rDNA-Ribosomaalne DNA(Ribosomal DNA)

1. SISSEJUHATUS

Männikärsakad on meie metsade põhilised kahjurputukad, kes kahjustavad enamasti rajatud okaspuukultuure, ent ka eri vanuses looduslikku uuendust. Toitudes raieistikele istutatud või seal kasvavate okaspuutaimede tüvekestel, võivad mardikad hävitada kogu okaspuukultuuri, tekitades sellega olulist majanduslikku kahju (Sibul 2014, 2015). Lisaks võib oletada, et okaspuutaimede hukkumisele aitavad kaasa ka erinevad seenpatogeene, mida männikärsakad oma kehakatetel ja seedekulglas edasi kannavad (Drenkhan jt, 2013). Kahjustatud kohast võib alguse saada ka seennakkus, kuna varem tehtud teadustööd on näidanud, et putukkahjurid võivad endaga kaasas kanda erinevaid haigustekitajaid (Viiri, 2004).

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli välja selgitada, milliseid seenpatogeene raiesmikel liikuvad männi- ja kuusekultuuride põhilised kahjurputukad oma kehakatetel ja seedekulglas edasi kannavad ning kas neid haigustekitajaid esineb ka putukkahjustusega taimedel. Teine töö peaeesmärk oli statistiliselt võrrelda hariliku (*Hylobius abietis*) ja väike-männikärsaka (*H. pinastri*) valmikute poolt levitatavaid seenekooslusi, kuna need sarnase bioloogiaga lüljalgsed on ka kõige sagedasemad okaspuutaimede kahjurid. Seega esitatud nullhüpotees eeldas, et männikärsakate vahel seenekoosluste osas statistilisi erinevusi ei esine. Lisaks võrreldi käesolevas töös teiste metsauuendusega seotud põhiliste kahjurputuka liikide poolt levitatavaid seenpatogeene. Uurimistöös kasutati lisaks kärsaklastele ka mõningaid ürasklaste liike – suur-saareürask (*Hylesinus crenatus*) ja väike-saareürask (*H. fraxini*) ning männi-juureürask (*Hylastes brunneus*). Seenekoosluste võrdlemiseks koguti proove ka hariliku kuuse (*Picea abies*) ja hariliku männi (*Pinus sylvestris*) taimedelt.

Kui varem on erinevate seenpatogeene levitajatenä uuritud peamiselt ürasklasi, kelle kehakatetelt on kõige rohkem leitud puidusinetust põhjustavate seenpatogeene eoseid, mis nakatavad ka okaspuukultuure (Wingfield jt, 1991). Tavaliselt sisaldavad kõige rohkem seenpatogeene eoseid kahjurputukate kitiinkestad (Six jt, 2003). Tunduvalt vähem on potentsiaalsete seenpatogeene kandjatena uuritud männikärsakaid, eriti Euroopas levivate männikärsaka liikide ja okaspuutaimede vahelisi seoseid seenpatogeene osas (Jankowiak jt, 2013).

Seened on väga olulisel kohal ökoliigilistes protsessides, olles siis lagundajateks, sümbiontideks või ka patogeeneideks. Arvatakse, et seeneliikide kogu arv võib olla vahemikus

1,5-5,1 miljonit (Blackwell, 2011). Traditsioonilised taimede seenpatogeenide määramise meetodid, mis põhinesid erinevatel morfoloogilistel parameetritel, on sedavõrd aeganõudvad ning vajavad patogeenide seente liigini määramiseks väga palju kogemusi. Samas võimaldab ainult morfoloogial põhinev meetod määrata vaid piiratud osa kogu seentest, kuna enamik seentest võivad olla ka morfoloogiliselt identsed (O'Brien jt, 2005). Selletõttu kasutatakse tänapäeval järjest enam seenekoosluste määramisel molekulaarseid meetodeid, kasutades spetsiifilisi markerjärjestusi. Võrreldes traditsiooniliste määramismeetoditega on molekulaarsed meetodid palju kiiremad ja täpsemad ning võimaldavad keskkonna proovidest identifitseerida väga palju erinevaid organisme (De Beeck jt, 2014). Seente määramine põhineb kaasajal enamasti ITS (Internal transcribed spacer) järjestustel, mis võeti unikaalse markerina kasutusele alles üsna hiljuti (Bellemain jt, 2010). Lisaks on seente määramine muutnud kiiremaks ja täpsemaks tänu suurte andmebaaside tekkimisele, mida ka pidevalt täiendatakse (Nilsson jt, 2006). ITS järjestuste töötlemiseks on loodud ka bioinformaatilisi programme, mis võimaldavad välja selekteerida kõik üleliigsed järjestused. Bioinformaatilise töötluse lõplikuks eesmärgiks on DNA järjestuste alusel moodustada võimalikult täpselt määratud taksonoomilisi üksusi (OTU) sisaldav tabel, mille abil on võimalik seenekooslusi ja elurikkust statistiliselt analüüsida (Gweon jt, 2015).

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Männikärsakad (*Hylobius* spp.)

Männikärsakad kuuluvad mardikaliste seltsi (Coleoptera) ja kärsaklaste sugukonda (Curculionidae), kus kokku on rohkem kui 50 000 liiki (Dillon jt, 2008). Eestis elab 4 männikärsaka liiki, kellest kõige haruldasem on – *Hylobius transversovittatus* ning kes registreeriti alles mõni aasta tagasi ning, kellel puudub seetõttu isegi eestikeelne liiginimi (Sibul, 2015). Kõige enam ohustavad istutatud okaspuutaimi kaks männikärsaka liiki, kellest kõige levinum on harilik männikärsakas (*H. abietis*) (Joonis 1) (Sibul jt, 2009). Männikärsakaid võib kohata terves Euraasias (Gourov, 2000). Männikärsakad on kõige ohtlikumad uuendusraie järgselt istutatud okaspuutaimedele ning looduslikule uuendusele (Day jt, 2004). Majanduslikku kahju põhjustavad kõige enam okaspuutaimedele männikärsakate valmikumud, kes toituvad okaspuutaimede tüvekeste koorest (Leather jt, 1999). Kahjustuse tõttu muutuvad okaspuutaimed nõrgemaks ning vastuvõtlikumaks seenhaigustele,

eriti intensiivse kahjustuse korral ka hukkuvad. Kui männikärsakate arvukus raiesmikel on väga suur, siis on nad võimelised hävitama kogu istutatud või looduslikult uuenenud okaspuutaimeid, tekitades sellega suurt majanduslikku kahju (Sibul jt, 2002). Hariliku männikärsaka valmikud on enamasti kuni 15 mm pikad, kitiinsete kehakatete põhivärvus on enamasti pruun, kattetiibadel esinevate kollakate tähnidega (Dillon jt, 2008). Putukas on eriti arvukas kuivematel männi- ja kuuseraiestikel. Niiskematel kuuseraiestikel võib leida temaga sarnase eluviisiga punakaspruuni põhivärvusega 7–10 mm pikkuseid väike-männikärsakaid (*H. pinastri*). Neljas liik on 12–16 mm pikkune suur-männikärsakas (*H. piceus*), kes asustab vanu paksukorbalisi mände ning keda kohtab raiestikel harva (Voolma, 2003).



Joonis 1. Hariliku (*Hylobius abietis*) (foto: O. Berlov) ja väike-männikärsaka (*H. pinastri*) (foto: K.V. Makarov) valmikud.

Männikärsakaid meelitab raiesmikele hulgaliselt kohale okaspuukändudel ja toorettest raiejäätmetest lenduvad lõhnühendid. Värskest saetud okaspuukändude juured on männikärsakatele sobivaks munemispaiaks. Munadest kooruvad tõugud, keda iseloomustab pehme ja värvuselt kreemjas keha ning paikne eluviis. Enamik oksapuude raie mahajäänud kändudel ja muud mullaga seotud mittekuivanud raidmed on kärsakate arenguks sobilikud kohad (Dillon jt, 2006). Männikärsakate arvukus võib Eesti raiesmikel ulatuda 100 000–150 000 isendini hektari kohta, soojema kliimaga Lääne-Euroopas kordades rohkem. Eestis istutatakse aastas maha 18 miljonit okaspuutaime, veerand kuni kolmandik hakkab männikärsakate kahjustuse tagajärjel (Sibul, 2014). Enamasti lahkuvad männikärsakate valmikud kändudel septembri kuus. Valmikud võivad jääda paikseks, kuid võivad rännata ka teistele raiesmikele. Valmikute aktiivsus on suurem enamasti märtsist oktoobrini. Männikärsakad võivad elada koguni neli aastat. Kogu talve perioodi veedavad nad metsakõdus (Leather jt, 1999).

2.2. Männikärsakad ja seenpatogeenid

Varem on uuritud erinevaid ürasklasi, kelle kehakatetelt on identifitseeritud erinevaid seenpatogeene, mis võivad puittaimedel põhjustada seennakkust, kuid männikärsakate osas on informatsiooni tunduvalt vähem ning jätkuvalt on veel ebaselge nende tähtsus seenpatogeenide levitajatena (Romón jt, 2007). Poola metsade raiesmikelt kogutud kärsaklaste kehakatetelt identifitseeriti 16-ne erineva puidusinetust põhjustava seenpatogeeni eoseid, kellest kõige levinumad olid *Leptographium procerum* ja *Ophiostoma quercus*. Vähem levinumad seeneliigid olid *Leptographium lundbergii*, *Ophiostoma floccosum*, *Ophiostoma piliferum* ja *Sporothrix inflata* eoseid (Jankowiak, 2013). Prantsusmaalt kogutud hariliku männikärsaka kehakatetelt on kõige rohkem identifitseeritud *Leptographium procerum* seenpatogeeni eoseid, lisaks ka *Leptographium wingfieldii* ja *Ophiostoma canum* seeneliike, kelle eosed paiknesid kõige enam kleepuva massina männikärsakate rindmiku dorsaalsel ja lateraalsel küljel (Piou, 1993). Lisaks on Inglismaalt ja Šotimaalt kogutud männikärsakate kehakatetelt määratud ka *Leptographium alethinum* seeneliigi eoseid, kes on morfoloogiliselt sarnased *Leptographium procerum* seenpatogeeniga (Jacobs jt, 2001).

2.3 Ürasklased (*Scolytinae*)

Ürasklased on väikesed (1–10 mm) putukad, kes kuuluvad mardikaliste (Coleoptera) seltsi kärsaklaste (Curculionidae) sugukonda ja ürasklaste (Scolytinae) alamsugukonda. Eestis on siiani leitud 68 liiki ürasklasi, igalühel neist on oma elupaik, arengukäik, eluviis ja nõuded toidule (Voolma, 2002). Kõik ürasklased on seotud puittaimedega ning neil on kindlad nõudmised toidupuude kvaliteedi suhtes, kuid enamik siiski neist asustab vaid nõrgestatud või hiljuti surnud puitu (Lindelöw jt, 1993). Siiski suudavad mõned ürasklased ohtra paljunemise korral rünnata ka elujõulisi puid. Sobiva puu leidmise korral eritavad esmaasukad agregatsiooniferomooni, mis meelitab ligi ka liigikaaslasi (Schroeder, 1988).

Eestis elavate ürasklaste hulgast on ühed olulisemad tüvekeste kahjurid kuuse-juureüraskid (*Hylastes cunicularius*) ja männi-juureüraskid (*H. brunneus*), kes on 3-5 mm pikkused mustad saledad mardikad, kes esinevad tihti koos männikärsakatega ja kahjustavad istutatud okaspuutaimede (eriti kuuskede) tüvekeste maapinnalähedast osa ja peajuurt, kuid võrreldes männikärsakatega, kes närivad tüvekestel laikudena koort väljaspoolt, kaevandavad juureüraskid lühikesi käike okaspuutaimede tüvekeste alaosas ja juurekaelal, ka peajuurel

allpool mullapinda, mis tihtipeale ulatub ka puitu (Voolma jt, 1997). Veel ühed olulised okaspuutaimede kahjurid on saareüraskid (*Hylesinus spp.*), kes kahjustavad enamasti saarepuid. Nendest kõige levinum on väike-saareürask (*H. fraxini*), kes asustab enamasti haigeid ja hiljuti kuivanud puid, eelistades õhema koorega nooremaid puid ja vanemate puude oksid. Vähem esineb suur-saareürask (*H. crenatus*), kes sigib surevatele, haigetele või väga vanadele puudele, eelistades ainult puidu paksukoorelist tüveosa. Ürasklastest asustavad saart veel sile saareürask (*H. varius*) ja karvane saareürask (*H. oleiperda*) (Õunap, 1996).

Toore okaspuumaterjali asustajatena tulevad arvesse eelkõige kooreüraskid (*Ips typographus*, *I. duplicatus*) kuusel ja säsiüraskid (*Tomicus piniperda*, *T. minor*) männil ning puiduüraskid (*Trypodendron spp.*), kes asustavad mõlema puuliigi puitu (Voolma, 2004). Teiste puittaimede (jalakas, künnapuu) olulised kahjurid on näiteks maltsaüraskid (*Scolytus spp.*), kes on tuntud ka seennakkuse levitajatena (Jacobi jt, 2013). Käesolevas töös kasutati ürasklaste kehakatetel ja sisikonnas leiduvate seenekoosluste määramisel suur-saareüraski, väike-saareüraski ja männi-juureüraski valmikuid (Joonis 2).



Joonis 2. Suur-saareürask (*Hylesinus crenatus*) (A) (foto: T. Kehlet), väike-saareürask (*H. fraxini*) (B) (foto: T. Kehlet) ja männi-juureüraski valmikud (*Hylastes brunneus*) (C) (foto: K. Walker).

2.4. Ürasklased ja seenpatogeenid

Okaspuutaimedele ei ole ohtlikud ainult nendest toituvad ürasklased, vaid olulised on ka nende poolt levitatavad seenpatogeenid. Varem tehtud uuringute käigus on leitud, et puittaimedele kahjustuste tekitamisel on oluline roll ka ürasklaste ja seenpatogeenide koostegutsemisel (Tsui jt, 2010) ja nende kiiremal hukkumisel (Solheim jt, 1998). Kõige olulisemad ürasklastega edasi kanduvad seenpatogeenid kuuluvad seltsi Ophiostomatales (klass Sordariomycetes) (Zhou jt, 2001). Näiteks *Ophiostoma clavigerum* toodab nii

mitospoore kui ka meiospoore limaja massina, mis on üraseklaste poolt hõlpsasti edasi levitatavad (Lee jt, 2007). Seenpatogeen ise paljuneb kiiresti peremees puidu sisekoos ning maltspuidus, tootes melaniini, mis muudab puidu värvust ja ummistab juhtsooni (Solheim jt, 1998). Teine oluline üraseklaste poolt levitatav seenpatogeen on *Leptographium longiclavatum*, kelle nakatamis katsed on näidanud, et seen põhjustab samuti puittaimedele kahjustusi (Rice jt, 2009). Mainitud kaks seeneliiki on morfoloogiliselt üsna sarnased, mistõttu nende eristamisel on vaja kasutada rDNA ITS järjestusi, mis on evolutsiooni käigus kiiresti muutunud (Lim jt, 2004). Puiduürasekite (*Trypodendron spp.*) puhul on leitud, et emasmardikas viib käike kaevandades endaga kaasa ka seeneeosed (nn. ambroosiaseened) (Dyer, 1967). Maltsaürasekid (*Scolytus spp.*) levitavad puult puule selliseid seenpatogeene nagu *Ophiostoma novo-ulmi* ja *O. ulmi*, mis põhjustavad juhtkudede haigusi (Jacobi, 2007). Samuti on oluline kooreürasekite (*Ips spp.*) poolt levitatav seenpatogeen *Diplodia pinea*, mis kahjustab enamasti Austria mändi (*Pinus nigra*) ning tekitab sellega majanduslikku kahju (Whitehill, jt 2007).

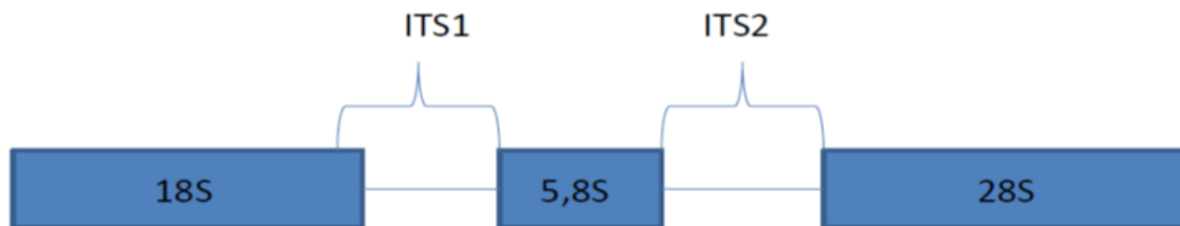
2.5. Seenpatogeenide tuvastamine

Tänapäeval kasutatakse seeneliikide tuvastamiseks molekulaarset meetodit, mida nimetatakse triipkoodistamiseks. ITS (Internal transcribed spacer) regiooni kasutamine kui triipkoodina seenekoosluste määramisel avastati üsna hiljuti (Schoch, jt 2012). Triipkoodistamine on taksonoomiline meetod, kus kasutatakse organismi DNA lühikest geneetilist markerit, et määrata kindla isendi kuuluvust teatud liiki. Esimesena kirjeldas seda meetodit Paul Herbert koos töökaaslastega, kelle eesmärgiks oli leida kiired ja täpsed taksonoomilised määramismeetodid, mida saaks kasutada erinevate organismide määramisel (loomad, taimed ja mikroorganismid) (Hebert jt, 2003, 2004). DNA triipkoodiks on sobiv selline marker, mille liikide vaheline varieeruvus on suurem kui liigisisene varieeruvus. Samuti peab DNA marker olema võimalikult lühike ja universaalsete praimerite poolt hõlpsasti amplifitseeritav (Kress jt, 2008). Lisaks peavad triipkoodistamisel kasutatavad praimerid olema suutelised amplifitseerima sihtmärk järjestusi keskkonnas, kus võib esineda DNA järjestusi ka teistest organismidest (Kosch jt, 2013). Triipkoodistamise osakaal suureneb pidevalt, eriti mikroorganismide ökoloogias, kus nende määramisel kasutatakse tihti molekulaarseid meetodeid. Selle tulemusena kuhjub pidevalt töötlemata andmeid, mille analüüsimine on kõige mahukam ja keerukam osa. Selletõttu on sekveneerimisandmete analüüsimiseks

arendatud erinevaid bioinformaatilisi meetodeid ja keerulisi programme, mis eeldavad järjest võimsamaid arvuteid (Balint jt, 2014). Tänapäeval on ITS regioon kõige laialdasemalt kasutatav marker, mille abil on võimalik määrata palju erinevaid seeneliike (Buee jt, 2009). Kuni 80-ndate lõpuni tuli seeneliikide määramiseks kasutada kultiveerimis meetodit, siis kaasajal põhineb seenekoosluste määramine enamasti DNA järjestustel, mis muudavad seenekoosluste määramise oluliselt kiiremaks ja lihtsamaks (De Beeck jt, 2014). Sellele aitab omakorda kaasa ka suured ja täpsed andmebaasid. Samuti võimaldavad uued DNA sekveneerimise tehnoloogiad uurida organisme nende looduslikus keskkonnas ning on täpsed ja kiired (Nilsson jt, 2009). Seda muidugi juhul kui uuritavad liigid on eelnevalt uuritud ja täpselt määratud. ITS1 ja ITS2 regioonide järjestamisel on praeguseks kasutatud palju erinevaid sekvenaatoreid (Buee jt, 2009). Algselt kasutati Sanger sekveneerimis meetodit seente ITS järjestuste määramisel, mis on võimaldanud iseloomustada näiteks mullaseente mitmekesisust (O'Brien jt, 2005). Järjest enam kasutatakse teise põlvkonna sekvenaatoreid, mis on ITS regioonide järjestamisel palju edukamad. Näiteks pürosekveneerimine on võrreldes Sangeri meetodiga tunduvalt kiirem ja odavam ning ei vaja kloneerimise etappe. Pürosekvenaatorite abil toodetak järjestuste hulk on mitu korda suurem ning järjestused on hea kvaliteediga ($> Q30$), mis oluliselt lihtsustab mulla seenekoosluste uuringuid (Buee jt, 2009). Algselt kasutati teise põlvkonna sekvenaatoreid ühe nukleotiidsete polümorfismide (SNP- single nucleotide polymorfism) määramisel, kuid on edukalt kasutatud ka kogu genoomi sekveneerimisel ja metagenoomika analüüsidel (Ronaghi jt, 1998, Ronaghi, 2001). Illumina Miseq sekvenaatorit on peetud ka 454 pürosekvenaatori järeltulijaks seente ITS järjestuste määramisel, kuid praegune Illumina sekveneerimistehnoloogia ei võimalda täielikult järjestada kogu ITS regiooni, kuna kogu regiooni keskmine pikkus on ~650 bp, kuid Illumina maksimaalseks lugemiks on ainult 300 bp, samas ITS1 ja ITS2 regioone eraldi on võimalik järjestada väga edukalt (Balint jt, 2014). Varem on seente ITS järjestuste määramisel kasutatud ka IonTorrent sekvenaatorit, kuid selle süsteemi puhul tekib väga palju vigu ITS järjestuste piirkonnas, kus tavaliselt paiknevad praimerid (Brown jt, 2013).

Samas on varem tehtud teadustöodes näidatud, et ITS1 ja ITS2 järjestusi eraldi määrata on tunduvalt kasulikum, kuna kahe ITS regiooni vahele jääb tugevalt konserveerunud 5,8S regioon, mis võib PCR reaktsioonide käigus tekitada kimäärseid järjestusi, mis võivad mõjutada lõpptulemust (De Beeck jt, 2014). Siiski sobib 5,8S regioon oma tugeva konserveerituse tõttu seondumiskohaks universaaletele praimeritele (Begerow jt, 2010). Tänapäeval on ITS kõige sagedamini sekveneeritav regioon mükoloogias. Alates 1990. aastatest on seente ITS järjestusi pidevalt sisestatud rahvusvahelisse nukleotiidsete järjestuste

andmebaasi (INSD-International Nucleotide Sequence Database) (Nilsson jt, 2008). ITS regioon koosneb kolmest alampiirkonnast: ITS1, 5,8S ja ITS2 regioon (Joonis 3).



Joonis 3. ITS1 ja ITS2 regioonide paiknemine seente ribosomaalsel DNA-l.

Nii ITS1 kui ka ITS2 regioon on kõrge evolutsioonilise astmega ning nad on tüüpiliselt liigi spetsiifilised (Kõljalg jt, 2005). ITS järjestuse kõrge koopia arv rakkudes võimaldab järjestusi määrata ka siis, kui vajaminev DNA kogus on madal, mis keskkonnast võetud proovide puhul on tavaline (Vilgalys jt, 1990). Kuigi kogu ITS regioonis sisaldub geneetilist informatsiooni tunduvalt rohkem kui ITS2 regioonis, siis väiksemate amplikonide tõttu on jällegi PCR reaktsioon palju efektiivsem ning tekib vähem kimäärseid järjestusi. Lisaks läheb vaja oluliselt vähem PCR tsükleid, et saavutada soovitud amplikonide kontsentratsioon (Ihrmark jt, 2012). Kimäärsed järjestused tekivad tavaliselt PCR reaktsioonide käigus ning moodustuvad kahe või enama liigi DNA järjestusest (Nilsson, jt 2006). Triipkoodistamise kui määramismeetodi lõplikuks eesmärgiks on erinevatest proovidest määratud ITS järjestused klasterdada taksonoomilisteks üksusteks (OTU), mis vastavad mingile kindlale ökoloogilisele liigile. Taksonoomiliste üksuste määramine liikideni võimaldab jälgida muutusi seenekoosluste osas või avastada uute invasiivsete seeneliikide olemasolu palju varem (Cristescu jt, 2014).

3. MATERJALID JA MEETODID

Kahjurputukate ja puittaimede proovid koguti Lõuna-Eesti erinevatest maakondadest (Tartumaa, Viljandimaa ja Võrumaa). Kahjurputukatest koguti nii männikärsakaid kui ka üraseklasi. Männikärsakatest koguti kaks liiki: harilik männikärsakas ja väike-männikärsakas. Lisaproovidena koguti kolm üraseklaste liiki: suur-saareürask, väike-saareürask ja männi-juureürask. Taimedel olevate seenekoosluste määramiseks ja võrdlemiseks koguti proovid uuendatud okaspuuraiesmikel männikärsakate poolt kahjustatud ja kahjustamata (tervetelt) harilik kuuse ja harilik männi kuni 4-aastatelt taimedelt. Lisaproove võeti raiesmikel asuvatest männi- ja kuusekändudelt.

3.1. Putukaproovid

3.1.1. Männikärsakate proovid

Männikärsakate püüdmiseks rajati püünisaugud suurusega $25 \times 40 \times 50$ cm. Püünisaugud on kõige levinum meetod männikärsakate ja teiste maapinnal liikuvate kahjurputukate kogumiseks. Atraktiivsuse tõstmiseks kasutatakse püünistes ka toidumeelistel põhinevaid toiduatraktante või suguferomooni (Sibul jt, 2006). Männikärsakate valmikute kogumiseks mõeldud püünisaugud rajati 2014. aasta kevadel okaspuutaimedega uuendatud värskete okaspuuraiesmikule. Igalt uuritavalt alalt koguti kahte männikärsaka liiki: hariliku männikärsaka ja väike-männikärsaka valmikuid. Putukad määrati (*det.* Ivar Sibul) Eesti Maaülikooli metsandus- ja maaehitusinstituudis.

Tabel 1. Männikärsakate proovid.

| Maakond | Ala | Koordinaadid | Peapuuliik | Putuka liik | Arv | Koguja/Aasta |
|----------|---------------|------------------------------------|------------|--------------------|-----|-------------------|
| Tartumaa | KS 218 | N:58° 20' 52,7", E: 26° 53' 44,01" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 15 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | KS 218 | N:58° 20' 52,7", E: 26° 53' 44,01" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 15 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 014 | N:58° 17' 29,5", E:26° 46' 23,8" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 12 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 014 | N:58° 17' 29,5", E:26° 46' 23,8" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 9 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 017 | N:58° 16' 44,9", E:26° 47' 5,1" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 15 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 017 | N:58° 16' 44,9", E:26° 47' 5,1" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 9 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 019 | N:58° 15' 47,6", E:26° 46' 9,3" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 12 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 019 | N:58° 15' 47,6", E:26° 46' 9,3" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 3 | I. Kivimägi, 2014 |
| Võrumaa | Ränna | N:57° 45' 21,6", E:26° 28' 53,2" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 20 | R. Drenkhan, 2014 |
| Võrumaa | Ränna | N:57° 45' 21,6", E:26° 28' 53,2" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 1 | R. Drenkhan, 2014 |
| Tartumaa | Järvselja | N:58° 16' 25,6", E:27° 16' 13,4" | Mänd | <i>H. abietis</i> | 10 | T. Drenkhan, 2014 |
| Tartumaa | Ülenurme vald | N:58°15'8,2", E:26°48'17,7" | Mänd | <i>H. pinastri</i> | 10 | T. Drenkhan, 2014 |

Kõik kogutud männikärsakad hoiti sügavkülmas ($-25 \pm 0,5$ °C). Putukatelt seente DNA eraldamiseks asetati igalt alalt kogutud üks harilik ja üks väike-männikärsaka valmik steriilsete pintsettidega 2 ml Eppendorfi tuubi. Kokku eraldati seente DNA-d 48-st männikärsaka proovist (25 hariliku männikärsaka proovi, 23 väike-männikärsaka proovi). Seente DNA eraldamiseks purustati metallkuulikeste abil kogu kahjurputukas, kuna seente eosed võisid paikneda nii kitiinkestal kui ka kahjurputuka seedekulglas. Igasse DNA tuubi lisati kaks autoklaavitud 3,2 mm diameetriga roostevabast terasest kuulikest (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) ning kahjurputukad purustati 10 min jooksul kasutades raputit Retsch Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Saksamaa). Purustatud materjalist DNA eraldamiseks kasutati MO BIO PowerSoil DNA isolation kit-i (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) vastavalt tootja protokollile.

3.1.2. Ürasklaste proovid

Lõuna-Eesti metsadest koguti lisaks veel 19 erinevat ürasklast. Ürasklastest koguti: männi-juureüraski, väike- ja suur-saareüraski valmiku. Suur-saareüraskite puhul koguti ainult 4 isendit. Männi-juureüraskite ja väike- saareüraskite valmiku koguti võrdselt 8 isendit (Tabel 2). Seente DNA-d eraldati üraskiproovidest eespool kirjeldatud meetodi järgi vastavalt tootja protokollile.

Tabel 2. Ürasklaste proovid.

| Maakond | Leiukoht | Koordinaadid | Putuka liik | Kogus | Koguja/Aasta |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------|-------------------|
| Tartumaa | Ülenurme vald | N:58°15'8,2" E:26°48'17,7" | <i>H. brunneus</i> | 8 | T. Drenkhan, 2014 |
| Viljandimaa | Jõeküla küla | N:58° 25' 25,9", E:25° 55' 6,5" | <i>H. fraxini</i> | 4 | I. Ermel, 2014 |
| Tartumaa | Järvselja Öppe- ja Katsemetskond | N:58° 16' 25,6", E:27° 16' 13,4" | <i>H. crenatus</i> | 3 | T. Drenkhan, 2014 |
| Tartumaa | Vedu küla | N:58° 13' 21,7", E:26° 41' 27,04" | <i>H. fraxini</i> | 4 | K. Adamson, 2014 |

3.2. Taimse materjali proovid

3.2.1 Okaspuu taimeproovid

Kahjurputukate poolt levitatavate seenekoosluste võrdlemiseks koguti ka noori okaspuutaimi (Tabel 3). Igalt alalt koguti sinna istutatud hariliku männi 2-aastaseid seemikuid ja hariliku kuuse 4-aastaseid istikuid, milledest pooled olid terved ning ülejäänud koorevigastustega (männikärsakate poolt kahjustatud) taimed. Kokku koguti 60 erineva taime proovi. Analüüsides kasutati ainult taime tüvekest. Steriilse skalpelliga lõigati nii tervetel kui ka kahjustusega taimedelt alates juurekaelast 5–10 cm kõrguselt paari sentimeetiline tüvelõik, mis asetati steriilsele Petri tassile. Petri tassile asetatud taimedelt kooriti skalpelliga ettevaatlikult koor. Peale igat nimetatut etappi steriliseeriti skalpell piirituses ja leeklambis, et vältida ristsaastet. Uuritav puiduosa asus sisekoore all, kambriumis. Igast taimeproovist lõigati ca 2 g uuritavat materjali. Kogu protseduur oli sama nii tervete kui ka kahjustusega taimeproovide puhul, kuid kahjustatud taimedelt lõigati rohkem pruunistunud koega koorealust osa. Uuritav materjal asetati samuti 2 ml DNA tuubi ning DNA eraldamiseks purustati materjal raputis metallist kuulikeste abil sarnaselt varem kirjeldatule. DNA eraldati sarnase meetodi järgi nagu putukaproovidel.

Tabel 3. Hariliku männi ja kuuse taimeproovid.

| Maakond | Ala nr | Koordinaadid | Peapuuliik | Terve kuusk | Haige kuusk | Terve mänd | Haige mänd | Koguja/Aasta |
|----------|--------|------------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------------|
| Tartumaa | QT 019 | N:58° 15' 47,7", E:26° 46' 9,3" | Mänd | 3 | 3 | 3 | 3 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 017 | N:58° 16' 44,9", E:26° 47' 5,1" | Mänd | 3 | 3 | 3 | 3 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | QT 014 | N:58° 17' 29,6", E:26° 46' 23,9" | Mänd | 3 | 3 | 3 | 3 | I. Kivimägi, 2014 |
| Tartumaa | KS 218 | N:58° 20' 52,7", E: 26° 53' 44,01" | Mänd | 3 | 3 | 3 | 3 | I. Kivimägi, 2014 |
| Võrumaa | Ränna | N:57° 45' 21,6", E:26° 28' 53,2' | Mänd | 3 | 3 | 3 | 3 | R. Drenkhan, 2014 |
| | | | | 15 | 15 | 15 | 15 | |

3.2.2. Okaspuu kännuproovid

Taimeproovidele lisaks koguti veel kahelt alalt 16 okaspuu kännuproovi. Okaspuu kännuproove oli samuti kaks erinevat liiki: harilik mänd ja harilik kuusk. Kõik okaspuu kännud olid silmnähtava kahjustusega. Kännuproovidest eraldati seente DNA-d eespool kirjeldatud meetodi järgi vastavalt tootja protokollile (Tabel 4).

Tabel 4. Okaspuu kännuproovid.

| Maakond | Ala | Geograafilised koordinaadid | Peapuuliik | Seisund | Kogus | Koguja/Aasta |
|----------|-----------|------------------------------------|------------|--------------|-------|------------------|
| Võrumaa | QB159_2 | N: 57° 49' 47,9", E: 26° 53' 23,1" | Mänd | Kahjustusega | 5 | R.Drenkhan, 2014 |
| Võrumaa | QB159_2 | N: 57° 49' 47,9", E: 26° 53' 23,1" | Kuusk | Kahjustusega | 1 | R.Drenkhan, 2014 |
| Põlvamaa | IM132_6_9 | N: 57° 54' 34,4", E: 27° 19' 18,4" | Mänd | Kahjustusega | 6 | R.Drenkhan, 2014 |
| Põlvamaa | IM132_6_9 | N: 57° 54' 34,4", E: 27° 19' 18,4" | Kuusk | Kahjustusega | 4 | R.Drenkhan, 2014 |

16

3.3. PCR amplifikatsioon ja geelelektroforees

PCR temperatuuritsükli viidi läbi kasutades aparate Eppendorf 5341 ja 6321 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Kokku tehti kõikide proovide puhul läbi 30 PCR tsükli. Kokku kasutati amplifitseerimisel 149 proovi (67 kahjurputuka proovi, 76 puiduproovi, 6 kontrollproovi). PCR reaktsioonisegu oli kokku 25 µl, mis sisaldas 18 µl vett, 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Mastermix (10 mM MgCl₂) (OÜ Solis Biodyne, Tartu, Estonia), 0,5 µl mõlemat praimerit (20 pmol) ja 1 µl sihtmärk DNA-d. ITS2 järjestuste amplifitseerimisel kasutati universiaalseid primereid: praimer gITS7 (5' - 3' GTGAATCATCGAATCTTTG) (Ihrmark jt, 2012), mis seondus seente rDNA 5,8S regiooniga ja praimer ITS4ngs (5' - 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Tedersoo jt, 2014), mis seondus seente rDNA 28S regiooniga. Praimeri ITS4ngs küljes oli lisaks veel 10-12 bp pikkuseid identifitseerimisjärjestused, mis võimaldasid bioinformaatilise töötluse käigus erinevaid proove ära tunda (Tedersoo, jt 2014). Esmene denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 min jooksul. Sellele järgnesid korduvad tsükli, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95 °C 30 s jooksul, praimerite gITS7 ja ITS4ngs seondumisest 30 s jooksul temperatuuril 55 °C ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 1 min kestel. PCR tsükli lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C, mis kestis 10 min. PCR produktid (5 µl) separeeriti geelelektroforeesil 1% agarosgeelil (SeaKem LE Agarose, Lonza Group Ltd, Basel, Šveits) 1% TBE puhvis 15 min. Geeli voolutati Biometra Compact M elektroforeesisüsteemis (Biometra GmbH, Goettingen, Saksamaa) voolupingega 10 V/cm. PCR produktid markeeriti etiidiumbromiidiga (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ja visualiseeriti UV valguses kasutades Bio-Vision 3026 WL süsteemi (Vilber Lourmet, Torcy, Prantsusmaa). Proovid, mille puhul bänd puudus või oli väga nõrk, amplifitseeriti uuesti ja teostati 35 PCR tsükli ning proovidel, millel oli bänd väga tugev, teostati 25 PCR tsükli. PCR reaktsioonide kvaliteedi kontrollimiseks kasutati ka positiivset ja negatiivset bändi. ITS2 ampliconide keskmine pikkus oli geelil ligikaudu 400 bp.

3.4. DNA puhastamine

Sekveneerimisele saadetud PCR produktid puhastati SequalPrep Normalization Plate (96) kiti (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA) kasutades. Igat PCR produkti võeti 25 µl ja pipetteeriti SequalPrep plaadile. Võrdses koguses lisati SequalPrep seondumis puhvrit (SequalPrep Normalization Binding buffer). Seejärel kaeti plaat PureLink tihendus teibiga (PureLink Foil Tape, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA) ning tehti kiire vortex ja tsentrifuugiti paari sekundi vältel kiirusel 3000 pööret minutis kasutades tsentrifuugi Eppendorf 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Seejärel inkubeeriti tund aega toatemperatuuril ning võimaldati DNA-l plaadi pinnale seonduda. Järgnes pesuetapp, kus vedelik aspireeriti kaevukestest ettevaatlikult, et mitte kaevukeste külgi puutuda. Lisati 50µl pesu puhvrit (SequalPrep Wash Buffer) kaevukestesse ja pipeteeriti ettevaatlikult üles ja alla, et eemaldada üleliigne osa. Pesupuhver eemaldati samuti aspireerimise teel ning allesjäänud vedelik eemaldati plaadi õrna koputamise teel filterpaberile. Järgnes elueerimise etapp, kus kaevukestesse lisati 20 µl elueerimise puhvrit (SequalPrep Normalization Elution Buffer). Kuni viis korda pipetteeriti puhvrit üles-alla, kaeti uuesti PureLink katte teibiga, tehti õrn vorteks ja lühike tsentrifuugimine, nagu eespool kirjeldatud. Edasi inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Seejärel lisati mõlemalt plaadilt võetud proovid kahte 1,5 ml tuubi. Enne sekveneerimist sadestati proovid välja etanoolis, kasutades Pellet Paint (Novagen, Merck, Darmsdat, Saksamaa) värvi. Protseduur teostati vastavalt tootja protokollile. Samuti mõõdeti enne sekveneerima saatmist üle DNA kontsentratsioonid, kasutades fluoromeetrit Qubit 2.0 fluoromeetrit ja Qubit dsDNA BR kaheahelalise DNA kontsentratsiooni mõõtmise süsteemi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA).

3.5. DNA sekveneerimine ja järjestuste bioinformaatiline analüüs

PCR produktide sekveneerimine teostati TÜ Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) tuumiklaboris (Tartu, Eesti). Järjestuse sekveneerimisel kasutati Illumina MiSeq (San Diego, California, USA) sekvenaatorit (2×300 bp). Bioinformaatilisel analüüsil kasutati ITS järjestuste töötluste meetodit, mis on mõeldud Illumina sekveneerimisplatvormi jaoks (Balint jt, 2014). Illumina järjestusi sisaldavad failid edastati lauaarvutisse (Intel core i7, 3,6 GHz, 32GB RAM) fastq formaadis. Töö esimese etapina toimus fastq failides järjestuste arvu esmane määramine ja kvaliteedi kontrollimine, kasutades javal põhinevat programmi FastQC High Throughput Sequence QC report (versioon 0.11.3, Babraham bioinformatics, Babraham institute, Babraham, UK). Ülejäänud bioinformaatilise töötluste etapid teostati Ubuntu linux (14.10 versioon) operatsioonsüsteemis. Esmalt eemaldati programmis Mothur (versioon 1.34.4, University of Michigan, USA 2014) kesise kvaliteediskooriga (Q) järjestused. Pärast seda liideti uuesti järjestuste ja kvaliteedi andmeid sisaldavad failid jälle kokku üheks fastq failiks, kasutades sama programmi. Halva kvaliteediskooriga järjestuste eemaldamise tõttu jäid mingi osa järjestustest ilma paarilisest. Ilma paariliseta jäänud järjestused eemaldati Python (64 bit) skripti abil. Järgmisena assambleeriti programmis PANDAseq (Masella jt, 2012) lugemite kattuvad 5' ja 3' järjestuste otsad omavahel kokku kontiigideks. Lisaks kõrvaldas programm järjestuste kvaliteedi alusel ka aluspaardumis vead kattuvatel aladel. Näiteks, kui järjestuste kattuvatel aladel esines kokkulangevusi aluspaardumiste osas, siis summaarne kvaliteediskoor Q suurenes, juhul kui esines ebakõlasi, siis kvaliteediskoor vähenes ja järjestustesse valiti ainult kõrgema Q skooriga aluspaar (Edgar jt, 2015). Pärast seda jäeti alles ainult need järjestused, mis sisaldasid korrektset identifitseerimisjärjestust. Alles jäänud järjestustest eemaldas programm Mothur (versioon 1.34.4, University of Michigan, USA, 2014) identifitseerimispraimerite fragmendid. Eelnevalt sisestati programmi koos käsuga ITS4ngs praimeril küljes olnud proovispetsiifilised 10-12 bp pikkused identifitseerimisjärjestused txt formaadis. Bioinformaatilise eeltöötluste kõige viimases etapis lõigati ITS2 järjestustest välja ka külgnevad 5,8S ja 28S rDNA fragmendid, kasutades programmi Fungal ITSx (Nilsson jt, 2010). ITS2 regiooniga külgnevad järjestused võivad mõjutada klasterdamise ja blastimise tulemusi, suurendades sarnasust järjestuste vahel (Nilsson jt 2010). Järjestuste sorteerimine ITSx programmis põhineb peidetud Markovi mudelil (HMM), mis mõeldab mingi järjestuse esinemise tõenäosust seente ribosomaalse DNA positsioonis (Bengtsson-Palme jt, 2013). Analüüside lihtsustamiseks sorteeriti programmiga USEARCH v7.0.1001 (Edgar, 2010) ITS2 järjestuste hulgast välja ainult unikaalsed järjestused ning eemaldati dublitseeruvad

järjestused. Lisaks eemaldati sama programmi abil ka kimäärsed järjestused vastavalt UNITE (Abarenkov, 2010) seente andmebaasile. Unikaalsed järjestused klasterdati taksonoomilisteks üksusteks järjestuste 97% sarnasuse alusel programmis CD-HIT (versioon 0.5, 7.03.2012, Dr. Weizhong Li, Burnhami instituut, USA). Klasterdamine programmis CD-HIT põhineb Greedy klasterdus algoritmil, kus järjestused sorteeritakse vastavalt pikkusele kahanevas järjekorras ning kõige pikemast järjestusest saab esimese klatri esindusjärjestus. Edasi võrreldakse ülejäänud järjestusi selle esindusjärjestusega sarnasuse alusel. Piisava sarnasuse korral lisatakse võrreldud järjestus sinna klattrisse ning kui sarnasus ei ole piisav, siis moodustub võrreldud järjestusest esindusjärjestus uues klattris (Weizhong Li jt, 2006). Viimases etapis toimus esindusjärjestuste blast UNITE (Abarenkov, 2010) ja NCBI GenBank andmebaasides (Bensson jt, 2015) ning moodustati seente taksonoomilisi üksusi (OTU) sisaldav tabel. Blastimine NCBI GenBank andmebaasis võimaldas määrata neid organisme, kelle ITS järjestused ei olnud amplifikatsiooni sihtmärgiks (Balint, jt 2014).

3.6. Tulemuste statistiline analüüs

Taksonite esinemise tabel normaliseeriti programmis Mothur (versioon 1.34.4, University of Michigan, USA, 2014), kus sekveneerimis sügavuseks arvestati 5933 järjestust. Sekveneerimis sügavus arvutati proovidest leitud summaarsete järjestuste alusel (mediaan). Männikärsakate proovide vahel hüpoteeside testimiseks kasutati T testi programmis Statistica (Statsoft, Round Rock, Texas, USA), kus nullhüpoteesi (H_0) kehtivuse jaoks oli oluline, et p-väärtus jääks suuremaks kui olulisusnivoo 0,05 ($p \geq 0,05$). Kui p-väärtus oli väiksem kui olulisusnivoo 0,05 ($p \leq 0,05$), siis nullhüpotees oli ümber lükatud ning õigeks tuli lugeda alternatiivset hüpoteesi. Taksonoomiliste üksuste jaotuse kirjeldamiseks erinevate proovide vahel kasutati Venni diagramme, mis koostati programmis Mothur. Männikärsakate proovidest määratud seenekoosluste osas arvutati ka Shannon-Weaneri diversiteedi indeks, kasutades valemit $H = -\sum (P_i \times \ln P_i)$, kus P_i tähistas seeneliikide suhtelist ohtrust (Hill, 2003). Lisaks arvutati ka diversiteedi tasakaalu indeks (E), kasutades valemit $E = H/H_{\max}$, kus $H_{\max} = -\ln(S)$, mis näitas seeneliikide suhtelist sagedust männikärsakate proovides. Kõige domineerivamad olid seenekooslused, mille suhtelise ohtruse P_i väärtus oli suurem kui Camargo index $1/S$, kus S tähistas liigirikkust (Camargo, 1993).

4. TULEMUSED

4.1. Üldised tulemused

4.1.1. Bioinformaatilise töötamise tulemused

Illumina MiSeq sekvenaatoriga järjestamisel saadi kokku 18 179 352 ja 2×300 bp pikkuseid paarduvate lõppudega lugemid (Paired-end reads). Esimeselt plaadilt saadi 7 569 746 lugemid, mille keskmine GC nukleotiidide sisaldus oli 46%. Teisel plaadilt saadi 10 609 606 lugemid, mille keskmine GC nukleotiidide sisaldus oli 51%. Kõige esimeses etapis filtreeriti välja järjestused, mille keskmine Q skoor oli väiksem kui 28. Pärast filtreerimist jäi alles 17 228 124 hea kvaliteediga järjestust. Peale järjestuste kattuvate fragmentide kokku liitmist kontiigideks saadi kokku 14 972 966 miljonit järjestust, kus keskmine järjestuste pikkus oli 377 bp. Kõige lühema järjestuse pikkus oli 151 bp ja kõige pikema järjestuse pikkus 587 bp. Korrektseid identifitseerimispraimerid järjestusi sisaldasid kokku 10 619 290 järjestust, millest hea kvaliteediga ITS2 järjestusi oli 7 497 042. Nende ITS2 järjestuste hulgast sorteeriti välja identsed järjestused ning jäeti alles ainult unikaalsed järjestused, mis moodustasid 29 883 klastrit. Osa klastritest sisaldas ainult ühte järjestuselementi (Singleton). Ühte järjestuselementi sisaldavad klastrid eemaldati ning alles jäi 13 517 taksonoomilist üksust (OTU). Lõplikku taksonoomia tabelisse lisati juurde ka kõik ülejäänud mittekimäärsed ITS2 järjestused, mis jäid alles peale Fungal ITSx programmi. Seega jäi lõplikku taksonoomia tabelisse 13 517 esindusjärjestusega kõige suurema sarnasusega järjestused. Tabelist eemaldati reostust ja positiivse kontrolli tulemusi sisaldavad taksonoomilised üksused. Lisaks eemaldati ka taksonoomilised üksused, mis ei kuulunud seentele ja sellised, kus oli väga vähe ITS2 järjestusi (kuni 10 järjestust). Veel eemaldati tabelist ka sellised taksonoomilised üksused, kus blasti tulemustes oli kehv kvaliteediskoor, kõrge e väärtus (e väärtus kõrgem kui e-50) ning järjestuste sarnasus võrreldes andmebaasiga alla 75%. Sellised taksonoomilised üksused olid suure tõenäosusega kimäärid ning ei kuulunud seentele. Lisaks eemaldati tabelist proovid, kus oli summaarselt vähem kui 1200 ITS2 järjestust proovi kohta. Pärast tabelist üleliigsete andmete eemaldamist jäi alles 3 445 905 seentele kuuluvat ITS2 järjestust ja 2227 taksonoomilist üksust (OTU) (Tabel 5). Lõplik ITS2 järjestuste keskmine pikkus tabelis oli 302 bp. Taksonoomilised üksused määrati liigini siis, kui ITS2 järjestused olid andmebaasidega sarnased vähemalt 98%-100% ulatuses. Järjestuste sarnasus vahemikus 90%-

97% võimaldas taksonoomilisi üksusi määrata vähemalt sugukonnani või perekonnani. Sarnasus andmebaasiga vahemikus 85-89% võimaldas taksonoomilisi üksusi määrata vähemalt seltsini ja sarnasus 80-84% vähemalt klassini.

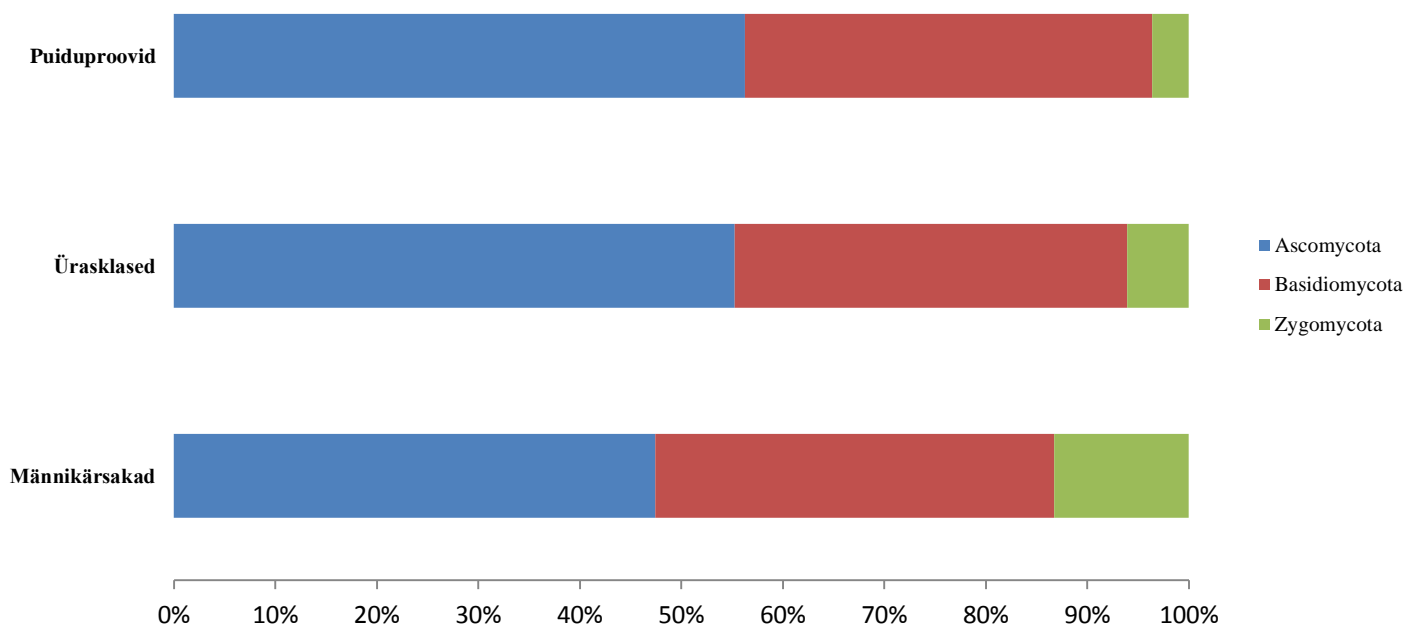
Tabel 5. ITS2 järjestuste bioinformaatilise töötuse etapid.

| Etapp | Programm/skript/andmebaas | Faili nimetus | Järjestused | Klastrid |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|----------|
| Järjestuste kvaliteedikontroll | FastQC | plaat 1 forward | 7 569 746 | |
| | | plaat 1 reverse | 7 569 746 | |
| | | plaat 2 forward | 10 609 606 | |
| | | plaat 2 reverse | 10 609 606 | |
| Järjestuste filtreerimine | Mothur | plaat 1 forward | 7 174 140 | |
| | | plaat 1 reverse | 7 174 140 | |
| | | plaat 2 forward | 10 053 984 | |
| | | plaat 2 reverse | 10 053 984 | |
| Paarilista järjestuste eemaldamine | fastqCombinePairedEnd.txt | plaat 1 forward | 6 611 628 | |
| | | plaat 1 reverse | 6 611 628 | |
| | | plaat 2 forward | 9 936 020 | |
| | | plaat 2 reverse | 9 936 020 | |
| Järjestuste assambleerimine | PANDaseq | Plaat 1 | 6 165 890 | |
| | | Plaat 2 | 8 807 076 | |
| Järjestuste identifitseerimine | Mothur+ fail oligos.txt | Plaat 1 | 4 266 629 | |
| | | Plaat 2 | 6 352 661 | |
| | | Plaat1+Plaat2 | 10 619 290 | |
| ITS2 ekstraktor | Fungal ITSx | Plaat1 | 3 998 824 | |
| | | Plaat2 | 3 498 218 | |
| | | Plaat1+Plaat2 | 7 497 042 | |
| Dereplikatsioon, kimäärid | USEARCH, UNITE | Plaat1+Plaat2 | 4 425 871 | |
| Klasderdamine | CD-HIT | Plaat1+Plaat2 | | 29 883 |
| Singletonide eemaldamine | CD-HIT | Plaat1+Plaat2 | | 13 517 |
| Esindusjärjestuste blast | UNITE, GenBank | Plaat1+Plaat2 | | 13 517 |
| Seente OTU tabel | MS excel 2010 | Plaat1+Plaat2 | 3 445 905 | 2227 |

4.1.2. Seentaksonite üldised tulemused

Kõige rohkem 2227-st ITS2 järjestuste alusel määratud taksonoomilistest üksustest kuulus hõimkonda kottseened (Ascomycota) ja kandseened (Basidiomycota). Kõige vähem määrati ikkeseente (Zygomycota) hõimkonda kuuluvaid taksonoomilisi üksusi. Üldiselt oli hõimkondade jagunemine erinevate proovide lõikes ühtlane. Kuigi ainult männikärsakate proovides oli ikkeseente hulka kuuluvate taksonoomiliste üksuste osakaal veidi suurem.

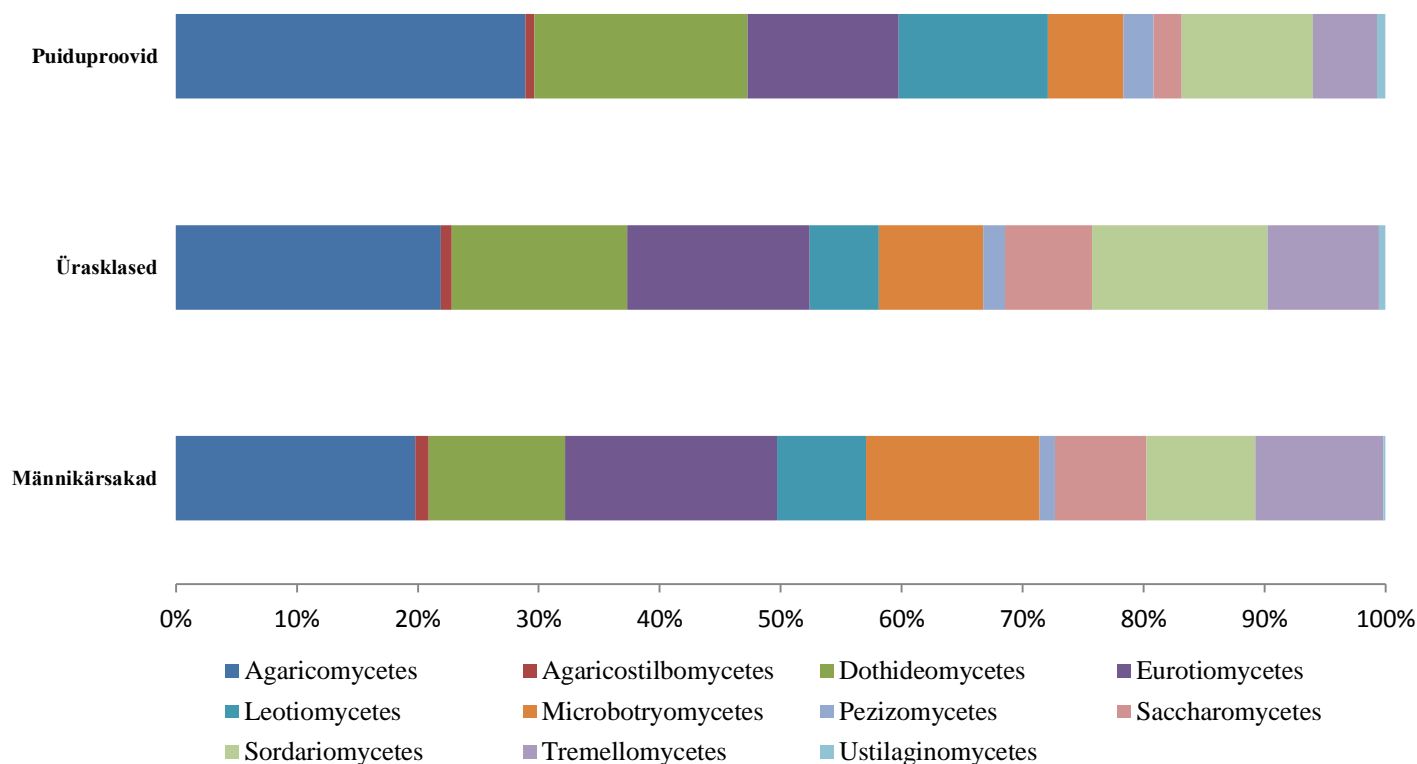
Kõige vähem ikkeseentele kuuluvaid taksonoomilisi üksusi määrati puiduproovidest. Seega jagunesid kõikidest proovidest määratud taksonoomilised üksused kolme seentele kuuluva hõimkonna vahel: kottseened, kandseened ja ikkeseened (Joonis 4).



Joonis 4. Seentaksonite jaotus proovides hõimkondade kaupa.

Käesoleva töö käigus erinevatest proovidest ITS2 järjestuste alusel määratud taksonoomilised üksused jagunesid 11 seentele kuuluva klassi vahel. Kõige rohkem taksonoomilisi üksusi määrati klassidesse Agaricomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Microbotryomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes ja Tremellomycetes. Kõige vähem taksonoomilisi üksusi määrati klasside Agaricostilbomycetes, Pezizomycetes ja Ustilaginomycetes hulgast. Erinevate proovide lõikes oli seente klassiline jaotus ebaühtlane. Kõige rohkem klassi Agaricomycetes hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi määrati puiduproovidest, kõige vähem kahjurputukate proovidest. Samuti sisaldasid puiduproovid võrreldes ülejäänud proovidega kõige rohkem taksonoomilisi üksusi, mis kuulusid klassi Dothideomycetes, kuid kahjurputukate proovides oli klassi Eurotiomycetes hulka kuuluvate taksonoomiliste üksuste osakaal suurem kui puiduproovidel. Vastupidiselt esines puiduproovides võrreldes kahjurputukate proovidega kõige rohkem klassi Leotiomycetes hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi. Samas oli kahjurputukate proovides klassidesse Microbotryomycetes ja Saccharomycetes hulka kuuluvate taksonoomiliste üksuste osakaal võrreldes puiduproovidega tunduvalt suurem. Erinevate proovide lõikes esines kõige rohkem

klassi Sordariomycetes kuuluvaid taksonoomilisi üksusi ürasklaste proovides. Kahjurputukate proovides oli võrreldes puiduproovidega suurem ka klassi Tremellomycetes kuuluvate taksonoomiliste üksuste osakaal (Joonis 5).



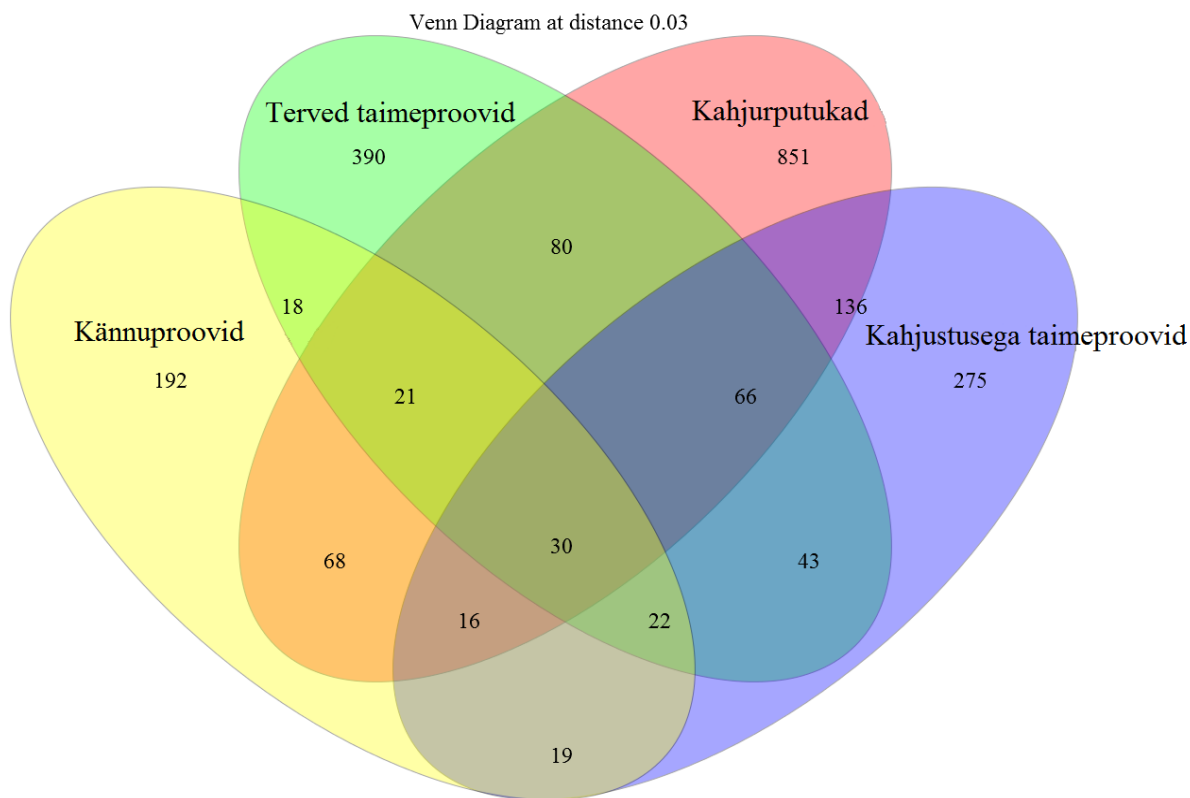
Joonis 5. Seentaksonite jaotus proovides klasside kaupa.

Seente 2227 taksonoomilisest üksusest (OTU) määrati perekonnaline kuuluvus 1536 (69%) OTU puhul. Kokku määrati seentaksonite osas ~300 erinevat perekonda. Ülejäänud 691(31%) taksonoomilise üksuse puhul jäid seente perekonnad tundmatuks. Nende puhul identifitseeriti pigem sugukonnad või seltsid. Erinevate proovide peale kokku identifitseeriti kõige rohkem perekond *Rhodotorula* hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi (OTU). Kokku määrati perekond *Rhodotorula* hulka kuuluvaid seentaksonideid 68 (3,05%). Ülejäänud 14 kõige levinumat seentaksonit olid perekonnad *Moriterella*, *Cladophialophora*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Inocybe*, *Penicillium*, *Sporolomyces*, *Russula*, *Cortinatus*, *Exophiala*, *Tomentella*, *Oidiodendron*, *Mycena* ja *Lachnum*. Kokku hõlmasid 15 kõige levinumat taksonoomilist üksust ~26% (567 OTU-t) 2227 seentaksonist (Tabel 6).

Tabel 6. Proovide lõikes ITS2 järjestuste alusel määratud 15 kõige levinumat seentaksonit.

| Hõimkond | Klass | Selts | Sugukond | Perekond | OTU-d | % 2227 OTU-st |
|---------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|------------|---------------|
| Basidiomycota | Microbotryomycetes | Sporidiobolales | Incertae sedis | <i>Rhodotorula</i> | 68 | 3,05% |
| Zygomycota | Incertae sedis | Mortierellales | Mortierellaceae | <i>Mortierella</i> | 62 | 2,78% |
| Ascomycota | Eurotiomycetes | Chaetothyriales | Herpotrichiellaceae | <i>Cladophialophora</i> | 58 | 2,60% |
| Basidiomycota | Tremellomycetes | Filobasidiales | Filobasidiaceae | <i>Cryptococcus</i> | 48 | 2,16% |
| Ascomycota | Saccharomycetes | Saccharomycetales | Saccharomycetaceae | <i>Candida</i> | 42 | 1,89% |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | Agaricales | Inocybaceae | <i>Inocybe</i> | 39 | 1,75% |
| Ascomycota | Eurotiomycetes | Eurotiales | Trichocomaceae | <i>Penicillium</i> | 39 | 1,75% |
| Basidiomycota | Microbotryomycetes | Sporidiobolales | Incertae sedis | <i>Sporobolomyces</i> | 39 | 1,75% |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | Russulales | Russulaceae | <i>Russula</i> | 28 | 1,26% |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | Agaricales | Cortinariaceae | <i>Cortinarius</i> | 26 | 1,17% |
| Ascomycota | Eurotiomycetes | Chaetothyriales | Herpotrichiellaceae | <i>Exophiala</i> | 26 | 1,17% |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | Thelephorales | Thelephoraceae | <i>Tomentella</i> | 25 | 1,12% |
| Ascomycota | Dothideomycetes | Incertae sedis | Myxotrichaceae | <i>Oidiodendron</i> | 24 | 1,08% |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | Agaricales | Tricholomataceae | <i>Mycena</i> | 22 | 0,99% |
| Ascomycota | Leotiomycetes | Helotiales | Hyaloscyphaceae | <i>Lachnum</i> | 21 | 0,94% |
| | | | | | 567 | 25,5% |

Erinevad seentele kuuluvad taksonoomilised üksused jagunesid nelja erineva proovigrupi vahel: kahjurputukad, kahjustusega taimeproovid, terved taimeproovid ja kännuproovid. Jooniselt võis näha, et osa proovidest määratud taksonoomilistest üksustest esines mitmes erinevas ning osa ainult kindlas proovis. Neli erinevat proovigruppi sisaldas kokku 2227 taksonoomilist üksust, millest väga suur osa taksonoomilistest üksustest esinesid ainult kindlas proovigrupis (kahjurputukad 851 (38,2%), kahjustusega taimeproovid 275 (12,3%), terved taimeproovid 390 (17,5%), kännuproovid 192 (8,6%)). Seega protsentuaalselt 77% (1708) taksonoomilistest üksustest määrati ainult kindlast proovigrupist. Proovide vahel kattuvaid taksonoomilisi üksusi leiti kokku 519 (23,3%). Kõige rohkem kattuvaid taksonoomilisi üksusi esines kahe proovigrupi ning kõige vähem nelja proovigrupi vahel. Jooniselt võis näha, et nelja proovigrupi vahel kattus ainult 30 (1,3%) taksonoomilist üksust. Kahe proovigrupi vahel esines kõige rohkem kattuvaid taksonoomilisi üksusi kahjurputukate ja kahjustatud taimeproovide vahel (11,1 % ehk 248 OTU-t) ning kõige vähem tervete taimeproovide ja kännuproovide vahel (4% ehk 91 OTU-t). Kahjurputukate ja tervete taimeproovide vahel oli kattuvaid seentaksoneid kokku 197 (8,8%) (Joonis 6).

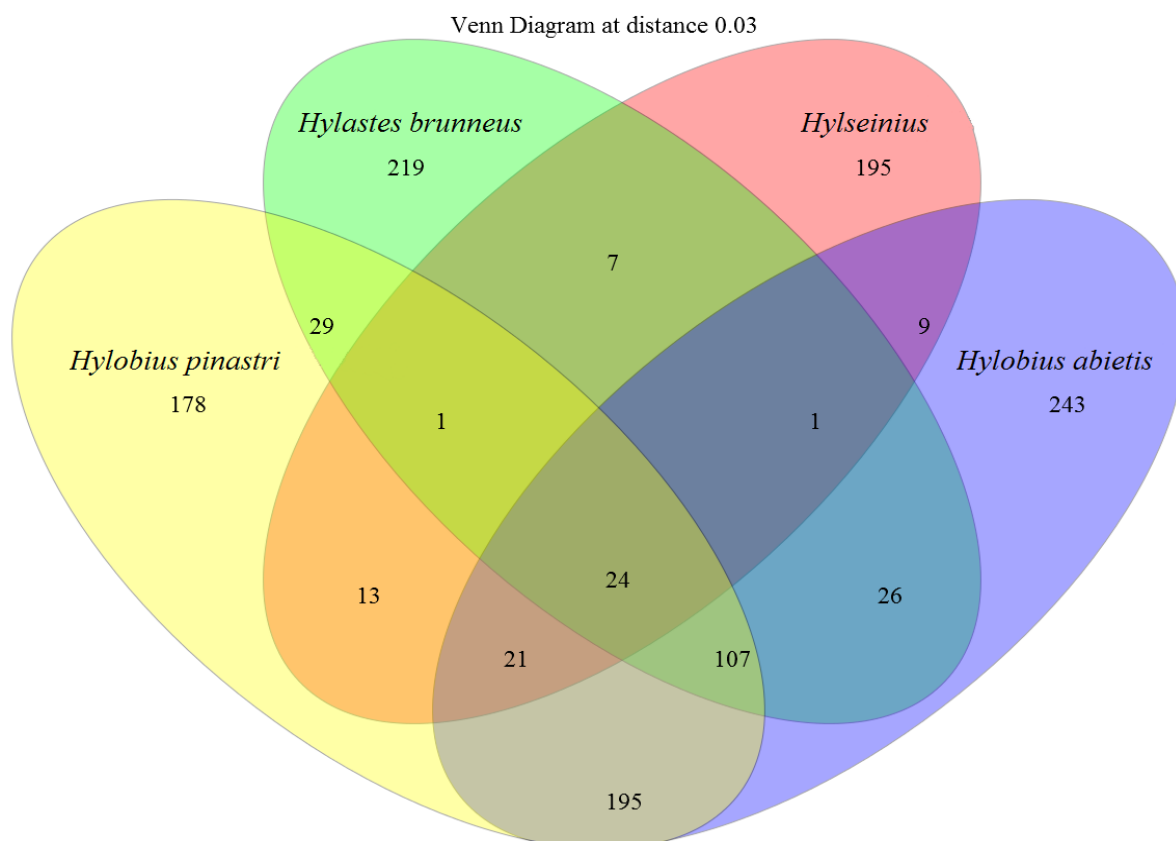


Joonis 6. Taksonoomiliste üksuste (OTU) jagunemine nelja erineva proovigrupi vahel.

4.2. Kahjurputukate proovides esinevad seentaksonid

Käesolevas osas kirjeldatakse kahjurputukate proovidest ITS2 järjestuste alusel määratud seentaksonid. Seentaksonid määrati nii väike-männikärsakate (*Hylobius pinastri*), harilike männikärsakate (*H. abietis*), männi-juureüraskite (*Hylastes brunneus*) kui ka saareüraskite valmikute (*Hylsenius*) proovidest. Saareüraskid arvestati üheks proovigrupiks, kuna suur-saareüraskite (*H. crenatus*) proove oli liiga vähe ja väike-saareüraskite (*H. fraxini*) proove tunduvalt rohkem. Kahjurputukate proovid sisaldasid kokku 1268 seentaksonit (OTU), millest suurem osa määrati ainult kindlast kahjurputuka proovist. Selliseid seentaksonid oli kokku 835 (66%) (*H. brunneus* 219 (17,3%), *H. abietis* 243 (19,2%), *H. pinastri* 178 (14%) ja *Hylseinius* 195 (15,3%). Kahjurputukate proovide vahel oli kattuvaid taksonoomilisi üksusi kokku 433 (34%). Suurem osa kattuvatest taksonoomilistest üksustest esinesid kahe kahjurputuka proovi ning kõige vähem nelja kahjurputuka proovi vahel. Nelja proovigrupi vahel kattus ainult 24 (1,9%) seentaksonit. Kahe proovigrupi vahel esines kõige rohkem kattuvusi seentaksonite osas harilike männikärsakate ja väike- männikärsakate proovide vahel. Kahe männikärsaka liigi vahel kattus koguni 350 (27,6%) seentaksonit. Kõige vähem

kattuvaid seentaksoneid esines ülejäänud kahjurputukatel saareüraskite (*Hylseinius* sp.) proovidega (Joonis 7). Mitmed kahjurputukate proovide vahel kattuvad seentaksonid identifitseeriti kui olulised puittaimede seenpatogeenid, kiire kasvuga saprotroofid või endofüüdid, millest tuleb juttu alljärgnevatel osades.



Joonis 7. Seente taksonoomiliste üksuste (OTU) jagunemine kahjurputukate proovide vahel.

4.2.1. Männikärsakate proovides esinevad seentaksonid

Käesolevas osas kirjeldatakse harilike männikärsakate (*Hylobius abietis*) ja väike-männikärsakate (*H. pinastri*) proovidest identifitseeritud seenetaksoneid. Lisaks testiti statistiliselt töö sissejuhatavas osas püstitatud hüpoteesi, mille alusel leiti seentaksonite t ja p väärtused. Testimisel lähtuti alternatiivsest hüpoteesist, mis eeldas, et harilike- ja väike-männikärsakate vahel esineb statistilisi erinevusi seenekoosluste osas. Statistilise andmeanalüüsi tulemusena selgus, et männikärsakate proovidest määratud seenekooslused ei olnud statistiliselt oluliselt erinevad. Seega jäi kehtima nullhüpotees, mis näitas, et männikärsakate vahel statistilised erinevused seenekoosluste osas puuduvad. Samuti jäid mitmete seenpatogeenide statistiku p väärtus suuremaks kui olulisusnivoo 0,05 ($p > 0,05$) (Tabel 7). Männikärsakate proovidest määrati neli tuntud seenpatogeeni, kelleks olid puidu haavandite ja vähktõbe tekitav *Nenoectria* sp. ($t=1,007$, $p=0,319$), tuntud taimede patogeen *Phoma herbarium* ($t=-0,095$, $p=0,924$), puidu sinetuse tekitajate rühma kuuluvad seenpatogeenid *Ceratocystis* sp. ($t=1,078$, $p=0,287$) ja *Ophiostoma* sp. ($t=1,342$, $p=0,186$). Lisaks esines männikärsakate proovides kuus tuntud saprotroofset seeneliiki: *Alternaria tenuissima*, *Ascocoryne cylichnium*, *Chalara holubovae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Cosmospora viridescens* ja *Irpex lacteus*. Männikärsakate proovides olid kõige sagedasemad seeneliigid *Ascocoryne cylichnium*, *Chalara holubovae*, *Curvibasidium cygneicollum*, *Nakazawaea holstii*, *Penicillium citreonigrum*, *Peterozyma xylosa* ja *Trichosporon dehoogii*. Männikärsakate proovides oli kõige sagedasemate seeneliikide suhtelise ohtruse väärtus P_i suurem kui $1/S$ ($P_i > 1/S$). Seeneliigid olid vähem levinumad kui suhtelise ohtruse väärtus P_i oli väiksem kui $1/S$ ($P_i < 1/S$). Algselt eraldati seente DNA 48-st männikärsaka proovist, kuid kahe proovi puhul ei õnnestunud seenekooslusi määrata, kuna summaarne ITS2 järjestuste hulk oli liiga väike. Seenetaksoneid õnnestus määrata 24-st hariliku männikärsaka ja 22-st väike-männikärsaka proovist. Männikärsakate proovides esinevate seentaksonite osas arvutati ka Shannon-Wiener diversiteedi indeks H ja tasakaalu indeks E (Eveness) (Tabel 7).

Tabel 7. Seentaksonite suhtelised sagedused (%) ja statistikute t ja p väärtused hariliku ja väike-männikärsakate valmikute proovides.

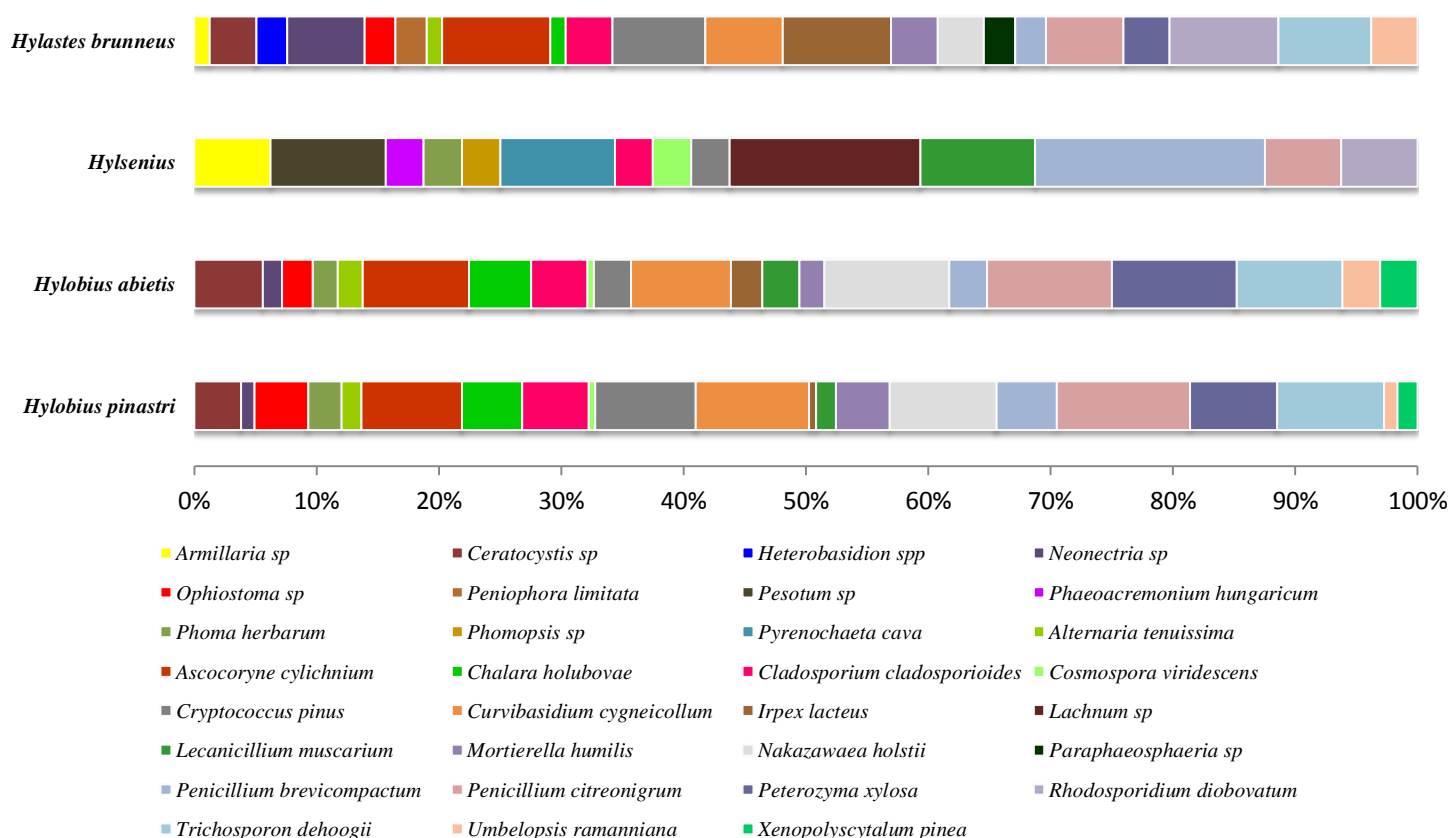
| Hõimkond | Klass | Liik | Männikärsakas | | t | p |
|--------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------|-------|
| | | | <i>Hylobius pinastri</i> | <i>Hylobius abietis</i> | | |
| | | | Esinemine proovides | Esinemine proovides | | |
| Ascomycota | Dothideomycetes | <i>Alternaria tenuissima</i> | 3 (13,64%) | 4 (16,67%) | -0,596 | 0,554 |
| Ascomycota | Leotiomycetes | <i>Ascoryne cylichnium</i> | 15 (68,18%) | 17 (70,83%) | -0,638 | 0,527 |
| Ascomycota | Sordariomycetes | <i>Ceratocystis</i> sp | 7 (31,82%) | 11 (45,83%) | 1,078 | 0,287 |
| Ascomycota | Leotiomycetes | <i>Chalara holubovae</i> | 9 (40,91%) | 10 (41,67%) | 0,336 | 0,739 |
| Ascomycota | Dothideomycetes | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 10 (45,45%) | 9 (37,5%) | 0,896 | 0,375 |
| Ascomycota | Sordariomycetes | <i>Cosmospora viridescens</i> | 1 (4,55%) | 1 (4,17%) | 0,915 | 0,365 |
| Basidiomycota | Tremellomycetes | <i>Cryptococcus pinus</i> | 15 (68,18%) | 6 (25%) | 0,153 | 0,879 |
| Basidiomycota | Microbotryomycetes | <i>Curvibasidium cygneicollum</i> | 17 (77,27%) | 16 (66,7%) | -0,356 | 0,723 |
| Basidiomycota | Agaricomycetes | <i>Irpex lacteus</i> | 1 (4,55%) | 5 (20,83%) | -1,252 | 0,217 |
| Ascomycota | Sordariomycetes | <i>Lecanicillium muscarium</i> | 3 (13,64%) | 6 (25%) | -0,470 | 0,641 |
| Zygomycota | Incertae sedis | <i>Mortierella humilis</i> | 8 (36,36%) | 4 (16,67%) | 1,704 | 0,095 |
| Ascomycota | Saccharomycetes | <i>Nakazawaea holstii</i> | 16 (72,73%) | 20 (83,33%) | 0,878 | 0,385 |
| Ascomycota | Sordariomycetes | <i>Neonectria</i> sp | 2 (9,09%) | 3 (12,5%) | 1,007 | 0,319 |
| Ascomycota | Sordariomycetes | <i>Ophiostoma</i> sp | 8 (36,36%) | 5 (20,83%) | 1,342 | 0,186 |
| Ascomycota | Eurotiomycetes | <i>Penicillium brevicompactum</i> | 9 (40,91%) | 6 (25%) | -0,110 | 0,913 |
| Ascomycota | Eurotiomycetes | <i>Penicillium citreonigrum</i> | 20 (90,01%) | 20 (83,33%) | 0,357 | 0,723 |
| Ascomycota | Saccharomycetes | <i>Peterozyma xylosa</i> | 13 (59,09%) | 20 (83,33%) | 0,681 | 0,499 |
| Ascomycota | Dothideomycetes | <i>Phoma herbarum</i> | 5 (22,73%) | 4 (16,67%) | -0,095 | 0,924 |
| Basidiomycota | Tremellomycetes | <i>Trichosporon dehoogii</i> | 16 (72,73%) | 17 (70,83%) | -0,147 | 0,884 |
| Zygomycota | Incertae sedis | <i>Umbelopsis ramanniana</i> | 2 (9,09%) | 6 (25%) | -1,152 | 0,256 |
| Ascomycota | Leotiomycetes | <i>Xenopolyscytalum pinea</i> | 3 (13,64%) | 6 (25%) | -1,522 | 0,135 |
| Proovide arv kokku | | | 22 | 24 | | |
| Isolaatide arv | | | 183 | 196 | | |
| H | | | 2,8 | 2,83 | | |
| S | | | 21 | 21 | | |
| E | | | 0,91 | 0,93 | | |
| 1/S | | | 0,048 | 0,048 | | |

Paksu kirjaga suhtelised sagedused tähistasid seeneliike, mille $P_i > 1/S$. **Pi** näitas seeneliigi suhtelist ohtrust. **H** tähistas Shannoni-Wieneri diversiteedi indeksit ja **E** liikide tasakaalu indeksit (Evenness).

4.2.2. Ürasklaste proovides esinevad seentaksonid

Kokku identifitseeriti ürasklaste proovidest 11 teada-tuntud seenpatogeeni. Ainuke poolparasiitne seeneliik, mis esines nii saareüraskite kui ka männi-juureüraskite proovides oli juure- ja juurekaela mädanikku põhjustav külmaseen (*Armillaria* sp.). Ülejäänud

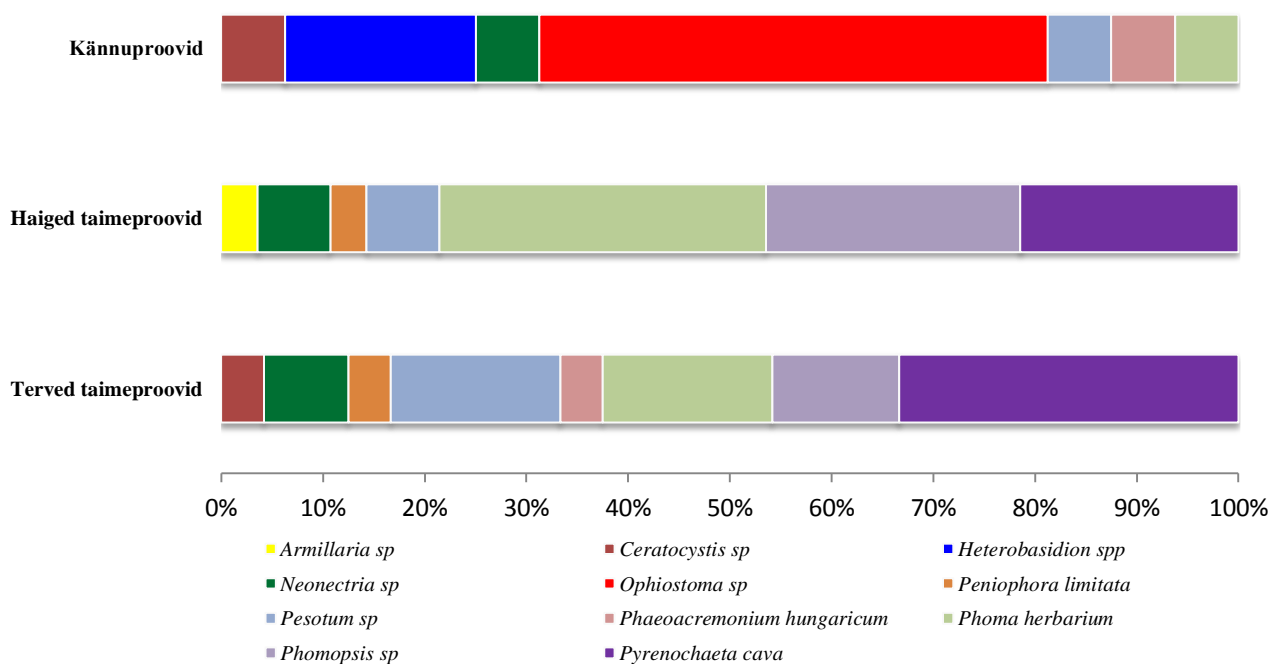
seenpatogeenide osas üraseklaste proovide vahel kokkulangevusi ei esinenud. Lisaks külmaseentele identifitseeriti männi-juureüraskite (*Hylastes brunneus*) proovidest veel viis seenpatogeeni, kelleks olid puidusinetuse tekitajate rühma kuuluvad *Ceratocystis* sp ja *Ophiostoma* sp, juure-ja juurekaela mädanikku põhjustav juurepess (*Heterobasidion* spp.), puidu haavandite ja vähktõve tekitaja *Neonectria* sp. ja taimede seenpatogeen *Peniophora limitata*. Saareüraskite (*Hylseinius* sp.) proovidest määrati samuti viis seenpatogeeni, kelleks olid puidusinetuse tekitajate rühma kuuluv *Pesotum* sp. ja taimede seenpatogeenid *Phaeoacremonium hungaricum*, *Phoma herbarium*, *Phomopsis* sp. ja *Pyrenochaeta cava*. Saareüraskite proovides moodustasid kõige suurema osakaalu seeneliigid *Pesotum* sp., *Pyrenochaeta cava*, *Lachnum* sp., *Lecanicillium muscarium* ja *Penicillium brevicompactum*, männi-juureüraskite proovides *Neonectria* sp., *Ascocoryne cylichnium*, *Cryptococcus pinus*, *Irpex lacteus*, *Penicillium citreonigrum*, *Rhodospodium diobovatum* ja *Trichosporon dehoogii* (Joonis 8).



Joonis 8. Seentaksonite koosseisuline jaotus kahjurputukate proovides.

4.3. Puiduproovides esinevad seenpatogeenid

Käesoleva töö peaesmärgiks oli leida, millised kahjurputukate proovidest identifitseeritud seenpatogeenid esinesid ka puittaimedel. Seenekoosluste võrdlemiseks kasutati ka terveid taimeproove. Käesoleva töö käigus koguti kokku 60 taimeproovi, millest 30 olid kahjustuseta (terved) ja 30 koorekahjustusega. Ainult ühest tervest taimeproovist ei õnnestunud seenekooslusi määrata, kuna ITS2 järjestusi oli proovis väga vähe. Männikärsakate kahjustatud koorega taimeproovidest identifitseeriti ITS2 järjestuste alusel teada-tuntud seenpatogeenidest juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat külmaseent (*Armillaria* sp.), puidu haavandite ja vähktõve tekitavat *Neonectria* sp., puidusinetuse tekitajate rühma kuuluvat *Pesotum* sp ja taimede seenpatogeene *Phomopsis* sp, *Pyrenochaeta cava* ja *Phoma herbarium*. Võrreldes kahjustatud taimeproove tervetega, siis selgus, et suur osa seenpatogeenidest olid kattuvad. Lisaks määrati tervetel taimedel puidusinetuse tekitajate rühma kuuluvaid seenpatogeene *Ceratocystis* sp. ja *Pesotum* sp., puidu haavandite ja vähktõve tekitajat *Neonectria* sp. ja teisi taimede seenpatogeene *Phaeoacremonium hungaricum*, *Phomopsis* sp., *Pyrenochaeta cava* ja *Phoma herbarium*. Ainult raiesmikel olevatel okaspuu kändudel identifitseeriti puidusinetuse tekitajat *Ophiostoma* sp. ja juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat juurepessu (*Heterobasidion* spp.). Lisaks määrati puidusinetuse tekitajatest veel *Ceratocystis* sp. ja *Pesotum* sp. seenpatogeene, puidu haavandite ja vähktõve tekitajat *Neonectria* sp. ja teistest taimede seenpatogeenidest veel *Phoma herbarium* ja *Phaeoacremonium hungaricum*. Männikärsakate poolt kahjustatud taimeproovides moodustasid mainitud seenpatogeenidest kõige suurema osakaalu *Phoma herbarium*, *Phomopsis* sp. ja *Pyrenochaeta cava*. Tervetes taimeproovides moodustasid kõige suurema osakaaluga seenpatogeenid *Phoma herbarium*, *Phomopsis* sp., *Pyrenochaeta cava*, ja *Pesotum* sp. Kännuproovidest määratud seenekooslused olid võrreldes taimeproovidega osade seenpatogeenide osas erinevad. Kännuproovides moodustasid kõige suurema osakaalu puidusinetust põhjustavate seenpatogeenide rühma kuuluv *Ophiostoma* sp. ja juurepess (Joonis 9).



Joonis 9. ITS2 järjestuste alusel määratud seenpatogeenide koosseisuline jaotus puittaimedes.

4.4. Seenpatogeenid kahjurputukatel ja puittaimedel

Erinevatest proovidest kogutud andmed näitasid, et kahjurputukate proovides olid kõige olulisemad ja tuntumad seenpatogeenid puidusinetuse tekitajate rühma kuuluvad *Ceratocystis* sp., *Pesotum* sp. ja *Ophiostoma* sp., juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavad külmaseened (*Armillaria* sp) ja juurepess, puude haavandite ja vähktõvede tekitaja *Neonectria* sp. ja muud taimede seenpatogeenid: *Phoma herbarium*, *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* ja *Phaeoacremonium hungaricum*. Mitmed kahjurputukate proovidest määratud seenpatogeenid esinesid ka puittaimedel. Puiduproovidest identifitseeriti ITS2 järjestuste alusel juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat külmaseent ja juurepessu, puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene *Ceratocystis* sp., *Ophiostoma* sp., *Pesotum* sp., puude haavandite ja vähktõvede tekitajat *Neonectria* sp. ja teisi taimede seenpatogeene *Peniophora limitata*, *Phoma herbarum*, *Phaeoacremonium hungaricum* ja *Pyrenochaeta cava*. Tulemused näitasid, et männikärsakate proovidest määratud puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene *Ceratocystis* sp. ja *Ophiostoma* sp. kahjustatud koorega taimeproovidest ei identifitseeritud. Samas esinesid tervetel taimeproovidel sellised seenpatogeenid nagu *Neonectria* sp. ja *Phoma herbarium*, kuid ainult koore kahjustusega taimeproovidelt identifitseeriti juure- ja juurekaela mädaniku põhjustavat külmaseent (*Armillaria* sp.), mida aga okaspuutaimede koorest toituvad

männikärsakad ei sisaldanud. Siiski võib oletada, et mainitud seenpatogeeni levimisel olid olulised männikärsakate poolt tekitatud koorekahjustused, mis muutsid okaspuutaimi nõrgemaks, tekitades stressi ning vähendades vastupanu võimet erinevatele seenpatogeenidele, sealhulgas ka külmaseentele. Seega võib öelda, et külmaseente edasi levimine koorekahjustusega okaspuutaimedele sõltub männikärsakate poolt tekitatud koorekahjustustest. Ainult kännuproovidest identifitseeriti puidusinetuse põhjustavat seenpatogeeni *Ophiostoma* sp. ning juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat juurepessu. Samas määrati *Ophiostoma* sp. seenpatogeeni nii männikärsakate kui ka männi-juureüraskite valmikute proovidest ning juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat juurepessu ainult männi-juureüraskite valmikutelt. Seega putukkahjurite valmikud kannavad oma kehakatetel ja sisikonnas väga palju erinevaid seentaksoneid, kellest mitmed on olulised puittaimede seenpatogeenid. Kuigi männikärsakate kehakatetelt või sisikonnast identifitseeriti puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene, kuid *Ophiostoma* sp. ja *Ceratocystis* sp. seenpatogeene ei tuvastatud koorekahjustusega istutatud ja looduslikult uuenenud okaspuukultuuridelt (Tabel 8).

Tabel 8. Putukkahjuritelt ja puittaimedelt määratud seenpatogeenid.

| Putukkahjurid | Seenpatogeenid |
|--------------------------|---|
| <i>Hylobius abietis</i> | <i>Ceratocystis</i> sp., <i>Neonectria ramulariae</i> , <i>Ophiostoma</i> sp., <i>Phoma herbarum</i> |
| <i>Hylobius pinastri</i> | <i>Ceratocystis</i> sp., <i>Neonectria ramulariae</i> , <i>Ophiostoma</i> sp., <i>Phoma herbarum</i> |
| <i>Hylastes brunneus</i> | <i>Armillaria</i> sp., <i>Ceratocystis</i> sp., <i>Heterobasidion</i> spp., <i>Neonectria</i> sp., <i>Ophiostoma</i> sp., <i>Peniophora limitata</i> |
| <i>Hylseinius</i> sp. | <i>Armillaria</i> sp., <i>Pesotum</i> sp., <i>Phaeoacremonium hungaricum</i> , <i>Phoma herbarum</i> , <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pyrenochaeta cava</i> |
| Puiduproovid | |
| Kahjustatud | <i>Armillaria</i> sp., <i>Neonectria</i> sp., <i>Peniophora limitata</i> , <i>Pesotum</i> sp., <i>Phoma herbarum</i> , <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pyrenochaeta cava</i> |
| Terved | <i>Ceratocystis</i> sp., <i>Neonectria</i> sp., <i>Peniophora limitata</i> , <i>Pesotum</i> sp., <i>Phaeoacremonium hungaricum</i> , <i>Phoma herbarum</i> , <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pyrenochaeta cava</i> |
| Kännud | <i>Ceratocystis</i> sp., <i>Heterobasidion</i> spp., <i>Neonectria</i> sp., <i>Ophiostoma</i> sp., <i>Pesotum</i> sp., <i>Phaeoacremonium hungaricum</i> , <i>Phoma herbarum</i> |

4.5. Seentaksonite esinemissagedused proovide lõikes

Käesoleva töö tulemused näitasid, et putukkahjurite proovides olid kõige sagedasemad seenpatogeenid puidusinetust põhjustavad seenpatogeenid *Ceratocystis* sp. ja *Ophiostoma* sp. Mainitud seenpatogeenidest oli *Ophiostoma* sp. esinemissagedus kõrge ainult

kännuproovides, kuid puudusid täielikult koorekahjustusega ja tervetes taimeproovides (Tabel 9).

Tabel 9. Seentaksonite esinemissagedused (%) erinevate proovides.

| Seeneliigid | <i>Hylobius pinastri</i> | <i>Hylobius abietis</i> | <i>Hylsenius</i> | <i>Hylastes brunneus</i> | Kahjustatud | Terved | Kännud |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Sagedus (%) | Sagedus (%) | Sagedus (%) | Sagedus (%) | Sagedus (%) | Sagedus (%) | Sagedus (%) |
| <i>Armillaria</i> sp. | - | - | 2 (18,2%) | 1 (12,5%) | 1 (3,3%) | - | - |
| <i>Ceratocystis</i> sp. | 7 (31,82%) | 11 (45,83%) | - | 3 (37,5%) | - | 1 (3,45%) | 1 (6,25%) |
| <i>Heterobasidion</i> spp. | - | - | - | 2 (25%) | - | - | 3 (18,75%) |
| <i>Neonectria</i> sp. | 2 (9,09%) | 3 (12,5%) | - | 5 (62,5%) | 2 (6,7%) | 2 (6,9%) | 1 (6,25%) |
| <i>Ophiostoma</i> sp. | 8 (36,36%) | 5 (20,83%) | - | 2 (25%) | - | - | 8 (50%) |
| <i>Peniophora limitata</i> | - | - | - | 2 (25%) | 1 (3,3%) | 1 (3,45%) | - |
| <i>Pesotum</i> sp. | - | - | 3 (27,3%) | - | 2 (6,7%) | 4 (13,79%) | 1 (6,25%) |
| <i>Phaeoacremonium hungaricum</i> | - | - | 1 (9,09%) | - | - | 1 (3,45%) | 1 (6,25%) |
| <i>Phoma herbarum</i> | 5 (22,73%) | 4 (16,67%) | 1 (9,09%) | - | 9 (30%) | 4 (13,79%) | 1 (6,25%) |
| <i>Phomopsis</i> sp. | - | - | 1 (9,09%) | - | 7 (23,3%) | 3 (10,34%) | - |
| <i>Pyrenochaeta cava</i> | - | - | 3 (27,3%) | - | 6 (20%) | 8 (27,59%) | - |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | 3 (13,64%) | 4 (16,67%) | - | 1 (12,5%) | 3 (10%) | 5 (17,24%) | - |
| <i>Ascocoryne cylichnium</i> | 15 (68,18%) | 17 (70,83%) | - | 7 (87,5%) | - | - | 14 (87,5%) |
| <i>Chalara holubovae</i> | 9 (40,91%) | 10 (41,67%) | - | 1 (12,5%) | 2 (6,7%) | 1 (3,45%) | - |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 10 (45,45%) | 9 (37,5%) | 1 (9,09%) | 3 (37,5%) | 10 (33,3%) | 2 (6,90%) | 5 (31,25%) |
| <i>Cosmospora viridescens</i> | 1 (4,55%) | 1 (4,17%) | 1 (9,09%) | - | - | - | 2 (12,5%) |
| <i>Cryptococcus pinus</i> | 15 (68,18%) | 6 (25%) | 1 (9,09%) | 6 (75%) | 6 (20%) | - | - |
| <i>Curvibasidium cygneicollum</i> | 17 (77,27%) | 16 (66,7%) | - | 5 (62,5%) | 5 (16,7%) | 1 (3,45%) | 1 (6,25%) |
| <i>Irpex lacteus</i> | 1 (4,55%) | 5 (20,83%) | - | 7 (87,5%) | - | - | - |
| <i>Lachnum</i> sp. | - | - | 5 (45,45%) | - | 5 (16,7%) | 4 (13,79%) | - |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> | 3 (13,64%) | 6 (25%) | 3 (27,3%) | - | 2 (6,7%) | 1 (3,45%) | 2 (12,5%) |
| <i>Mortierella humilis</i> | 8 (36,36%) | 4 (16,67%) | - | 3 (37,5%) | 1 (3,3%) | 2 (6,9%) | 2 (12,5%) |
| <i>Nakazawaea holstii</i> | 16 (72,73%) | 20 (83,33%) | - | 3 (37,5%) | 2 (6,7%) | 1 (3,45%) | 1 (6,25%) |
| <i>Paraphaeosphaeria</i> sp. | - | - | - | 2 (25%) | 5 (16,7%) | 1 (3,45%) | - |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> | 9 (40,91%) | 6 (25%) | 6 (54,5%) | 2 (25%) | 1 (3,3%) | - | 5 (31,25%) |
| <i>Penicillium citreonigrum</i> | 20 (90,01%) | 20 (83,33%) | 2 (18,2%) | 5 (62,5%) | 3 (10%) | 2 (6,9%) | 9 (56,25%) |
| <i>Peterozyma xylosa</i> | 13 (59,09%) | 20 (83,33%) | - | 3 (37,5%) | - | 2 (6,9%) | 1 (6,25%) |
| <i>Rhodosporidium diobovatum</i> | - | - | 2 (18,2%) | 7 (87,5%) | 2 (6,7%) | 2 (6,9%) | - |
| <i>Trichosporon dehoogii</i> | 16 (72,73%) | 17 (70,83%) | - | 6 (75%) | - | 1 (3,45%) | 2 (12,5%) |
| <i>Umbelopsis ramanniana</i> | 2 (9,09%) | 6 (25%) | - | 3 (37,5%) | - | - | 2 (12,5%) |
| <i>Xenopolyscytalum pinea</i> | 3 (13,64%) | 6 (25%) | - | - | 3 (10%) | - | 2 (12,5%) |
| Proovide arv | 22 | 24 | 11 | 8 | 30 | 29 | 16 |
| Isolaatide arv | 183 | 196 | 32 | 79 | 78 | 49 | 64 |
| Liikide arv | 21 | 21 | 14 | 23 | 21 | 21 | 20 |

5. ARUTELU

Käesolevas magistritöös identifitseeriti seente rDNA ITS2 järjestuste alusel, milliseid seenpatogeene kannavad erinevad puittaimede kahjurputukad oma kitiinkestal või sisikonnas. Männikärsakate proovidest identifitseeritud seenpatogeene võrreldi okaspuutaimedel esinevate seenekooslustega.

Illumina Miseq sekveneerimine ja järjestuste bioinformaatiline analüüs

Käesolev tööga näidati, et ainult ITS2 järjestuste abil saab väga edukalt identifitseerida seenpatogeene erinevatest proovidest (kahjurputukad, puiduproovid). Töö käigus leiti, et bioinformaatilise töötuse käigus läheb kaduma väga suur osa järjestustest. Kõige rohkem järjestusi läks kaduma järjestuste assambleerimise etapis ja aluspaardumis vigu sisaldavate identifitseerimispraimerite tõttu. Algselt moodustasid ~7 miljonit ITS2 järjestust 29 883 klastrit, millest 16 366 klastrit sisaldas ainult ühte järjestuselementi (Singleton). Edasise töötuse käigus ühte järjestuselementi sisaldavad klastrid eemaldati. Kirjanduse andmetel on need soovitatud eemaldada, kuna need sisaldavad tavaliselt vigade rohkeid järjestusi ja muid sekveneerimisvigu (Brown jt, 2015). Lõplikku taksonoomia tabelisse jäid alles esindusjärjestustega kõige suurema sarnasusega järjestused, mis moodustasid kokku 13 517 taksonoomilist üksust. Osa alles jäänud taksonoomilistest üksustest sisaldas ka kontrollproove, reostust, kimääre ning järjestusi teistest organismidest. Kõiki kimäärseid järjestusi ei olnud võimalik bioinformaatiliste meetoditega välja sorteerida. Pärast andmete sorteerimist jäi seentele kuuluvaid ITS2 järjestusi alles ~3,4 miljonit (49%) ja seentele kuuluvaid taksonoomilisi üksusi 2227 (17%). Võrreldes tehtud tööd kirjanduse andmetega, kus ITS2 järjestuste määramisel kasutati samuti Illumina Miseq (2x250 bp) sekvenaatorit ning seente DNA eraldati erinevatest piirkondadest kogutud mullaproovidest. Mullast eraldatud amplikonide alusel saadi kokku ~40 miljonit ja 2x250 bp pikkuseid paarduvate lõppudega lugemit, millest peale bioinformaatilist töötust jäi alles ainult ~10 miljonit (25%) hea kvaliteediga ITS2 järjestust, mis algselt moodustasid 16 623 taksonoomilist üksust (OTU). Nende ITS2 järjestuste hulgast kuulusid seentele ~6 miljonit (60%) järjestust, mis jagunesid 3208 (19%) taksonoomilise üksuse (OTU) vahel. Seega läks kokku erinevate bioinformaatiliste töötus etappide peale kaduma umbes ~30 miljonit järjestust (75%), millest ~20 miljonit järjestust läks kaduma selletõttu, et järjestuste algused ja lõpud ei sisaldanud korrektseid praimerjärjestusi (Balint jt, 2014). Võrreldes Balint jt, 2014.a saadud andmeid käesoleva tööga,

siis on näha, et bioinformaatilise töötuse lõpptulemusena jäi alles protsentuaalselt samas suurusjärgus seentele kuuluvaid järjestusi ja taksonoomilisi üksusi (OTU). Siiski jäi käesolevas töös bioinformaatilise töötuse käigus rohkem alles hea kvaliteediga ITS2 järjestusi. Samuti läks mõlema töö puhul kõige rohkem järjestusi kaduma aluspaardumis vigu sisaldavate identifitseerimispraimerite tõttu. Võrreldes käesolevat tööd veel Schmidt jt, 2013.a tehtud teadustööga, kus samuti kasutati Illumina MiSeq sekvenaatorit järjestuste määramisel ITS1 regioonist. Proovid koguti samuti mullaproovidest. Sekveneerimisel saadi ~4,2 miljonit järjestust, millest peale assambleermist jäi alles ~3,7 miljonit järjestust. Pärast identifitseerimisjärjestuste eemaldamist jäi alles ~2,6 miljonit järjestust ning pärast kimäärsete järjestuste eemaldamist ~2,5 miljonit ITS1 järjestust, millest seentele kuulusid ~0,9 (36%) miljonit järjestust. Samuti leiti mainitud töö käigus, et kõige rohkem järjestusi läks kaduma järjestuste assambleerimise etapis või aluspaardumis vigu sisaldavate identifitseerimispraimerite tõttu (Schmidt jt, 2013). Kokkuvõtvalt võib öelda, et järjestuste bioinformaatiline andmetöötlus oli küllaltki aeganõudev protsess. Järjestuste bioinformaatiliseks töötuseks ei olnud vajalik omada põhjalikke teadmisi programmeerimisest, kuid vajalikud olid algteadmised UNIX käskudest. Kuna andmete mahud olid väga suured, siis vajab bioinformaatiline töötlus väga võimeka protsessoriga ja muutmäluga lauarvutit.

Erinevate seente rDNA regioonide rakendatavus seenekoosluste määramisel

Käesolevas töös määrati ITS2 järjestuste alusel kõige rohkem kottseentele (~50%) (Ascomycota) kuuluvaid taksonoomilisi üksusi. Veidi vähem määrati kandseentele (~40%) (Basidiomycota) kuuluvaid OTU-si ning ainult 10% taksonoomilistest üksustest kuulus ikkeseentele (Zygomycota). Taksonoomiliste üksuste puhul määrati kõige rohkem seente klasse Agaricomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Microbotryomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes ja Tremellomycetes. Kaasajal on ITS regioon kõige enam kasutatav rDNA piirkond seente määramisel. Kuigi alternatiivsed ribosomaalsed DNA markerid asuvad ka suure subühiku (LSU/28S) ja väikese subühiku (SSU/18S) regioonides, siis neid regioone kasutatakse pigem seente fülogeneetilisel analüüsil, eriti kui tegemist on evolutsiooniliselt seente varasemate liinidega nagu hõimkonnad Zygomycota, Cytridiomycota ja Glomeromycota. Erinevate seente määramisel sõltub tulemus ka valitavast analüüsi meetodist, rDNA regioonist ja kasutatavatest praimeritest (Tedersoo jt, 2015). Käesolev töö näitas, et ainult ITS2 regiooni abil on võimalik määrata väga palju erinevaid seenekooslusi nii kahjurputukate kui ka puiduproovidest. Varem on ITS regioone kasutatud seente triipkoodistamisel paljudes erinevates teadustöodes, seega tegu on unikaalse markeriga.

Tihti peale suudetakse ühe rDNA markeri abil taksonoomiline mitmekesisus määrata vähemalt hõimkonna või klassi tasemele, kuid teatud seeneliikide täpsemaks määramiseks tuleb kasutada ka mõnda teist rDNA regiooni, kasutades näiteks ITS ja LSU marker regioonide kombinatsioone. Varem on erinevate markerite kombinatsioon andnud häid tulemusi seeneliikide molekulaarsel eristamisel viljakehadest (Schoch jt, 2012). Mitme marker regiooni kasutamine on vajalik ka sellisel juhul, kui seeneliikide ITS2 järjestused on identsed, näiteks perekond *Aspergillus* puhul. Nende määramisel liikideni on vaja kasutada veel mõnda teist rDNA marker regiooni (Geiser jt, 2007). Lisaks on varem näidatud, et ITS järjestustel põhinevaid määramismeetodeid on võimalik rakendada ka teiste organismide peal, nt vetikad Chlorophyta (Buchheim jt, 2011; Li jt, 2011) kui ka Oomycota (Robideau jt, 2011). Veel on näidatud, et erinevad rDNA regioonid (ITS1, ITS2, kogu ITS, SSU ja LSU) võimaldasid seentaksoneid määrata perekonnani väga väikesete erinevustega (1-2%) ning väga väikesed erinevused olid ka kahe ITS regiooni (ITS1, ITS2) vahel (kuni 1% erinevus) (Porrás-Alfaro, jt 2014). Võrreldes käesolevat tööd kirjandusel põhinevate andmetega, kus omavahel võrreldi ITS1 ja ITS2 järjestuste blasti tulemusi andmebaasides, saadi käesolevas töös tulemused hõimkonna tasandil üsna sarnased. Mullaproovidest eraldatud seente ITS1 järjestuste blasti tulemused andsid 44% kottseente ja 34% kandseente hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi. ITS2 regioonide puhul leiti vastavalt 47% Ascomycota ja 31% Basidiomycota hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi. Selline väike erinevus võis tulla ka praimerite eripärast. Ikkeseente hulka kuuluvaid taksonoomilisi üksusi määrati mõlema regiooni puhul 10-11% (Blaalid jt, 2013).

Kahjurputukatel esinevad patogeensed seened

Käesoleva töö käigus leiti, et kahjurputukate proovides olid kõige olulisemad ja tuntumad patogeensed seened puidusinetuse tekitajad *Ceratocystis* sp., *Pesotum* sp. ja *Ophiostoma* sp., juure- ja juurekaela mädaniku põhjustavad külmaseened (*Armillaria* sp.) ja juurepess (*Heterobasidion* spp), puittaimede haavandite ja vähktõve tekitaja *Neonectria* sp. ja teised taimede patogeendid: *Phoma herbarium*, *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* ja *Phaeoacremonium hungaricum*. Varem on kõige rohkem okaspuutaimede kahjurputukatelt identifitseeritud puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene. Puidusinetust põhjustavate patogeensete seente rühma kuuluvad mitmed morfoloogiliselt sarnaste seente perekonnad: *Ophiostoma*, *Grosmannia*, *Ceratocystiopsis*, *Ceratocystis*, *Gondwanamyces* ja *Cornuvescia*. Lisaks jagunevad need seente perekonnad kaheks fülogeneetiliselt erinevaks grupiks: perekond *Ophiostoma* sarnased seened, mis on lähedased seente seltsile *Dothideales* ja perekond

Ceratocystis sarnased seened, mis on lähedased pigem seente seltsile *Microascales* (Zipfel jt, 2006). Lisaks on perekond *Ophiostoma* lähedaselt seotud mitmed anamorfsed seeneliigid nagu perekond *Pesotum*, *Leptographium*, *Sporothrix* ja *Hyalorhinocladia*. Teised anamorfsed seeneliigid nagu perekond *Graphium* ja *Thielaviopsis* on lähedased pigem seente perekonnale *Ceratocystis* (Wingfield jt, 1993). Mitmed puidusinetust põhjustavad seenpatogeenid aitavad kahjurputukatel surmata okaspuutaimi, vähendades vee liikumist puittaimede juhtsoontes (Solheim, 2001). Varem tehtud teadustöodes on kahjurputukatelt seenpatogeenide identifitseerimisel kasutatud väga erinevaid meetodeid, näiteks Põhja-Hispaaniast kogutud putukakajurite proovidest määrati kokku 16 erinevat perekonda *Ophiostoma* kuuluvat puidusinetust põhjustavat seenpatogeeni, kellest kõige rohkem leiti *Ophiostoma ips*, *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma stenoceras*, and *Ophiostoma piceae* seeneliike. Mainitud seeneliikide järjestuste määramisel kasutati ABI PRISM autosekvenaatorit ning järjestati kogu seenpatogeenide ITS regioon (ITS1-5,8S-ITS2) (Romón jt, 2007). Varem on puidusinetust põhjustavate seenpatogeenide kiiremaks määramiseks kahjurputukatelt kasutatud ka spetsiifilisi fluorentseeruvaid hübridisatsiooni sonde (*Padlock probe*), mis disainiti seenpatogeenide ITS järjestuste alusel. Hübridisatsiooni sondid seondusid spetsiifiliselt SNP järjestustega rDNA geenide regioonis. Preameri seondumine tehti kindlaks reaalaaja PCR (RT-PCR) abil (Tsui jt, 2010). Sugukonda Ophiostomataceae hulka kuuluvad seeneliigid on ühed olulisemad puidusinetust põhjustavad seenpatogeenid, mis põhjustavad okaspuude juhtkudede ummistumist ja puidu värvuse muutumist ehk puidu sinetust, mille tõttu võivad okaspuutaimed hukkuda. Sellised patogeensed seened põhjustavad suurt majanduslikku kahju, rikkudes väärtuslikku tööstuspuitu (Plattner, jt 2008). Mäestiku-männiüraskite (*Dendroctonus ponderosae*) proovides, kus kasutati mainitud spetsiifilisi hübridisatsiooni sonde, määrati kõige rohkem kahte sugukonda Ophiostomataceae kuuluvat seeneliike, milleks olid *Grossmania clavigera* (sün. *Ophiostoma clavigera*) 90% (29/31) ja *Leptographium longicalvatum* 29% (9/31). Lisaks määrati mäestiku-männikärsakate proovidest seenpatogeenide perekonda *Ophiostoma* ja *Ceratocystiopsis* kuuluvaid seeneliike (Tsui jt, 2010). Veel on patogeenseid seeni määratud kooreüraskitelt, mis koguti Poola metsadest. Mainitud töös eraldati seente eosed kahjurputukate kehakatetelt söötmel kultiveerimise meetodil. Samuti määrati kooreüraskitelt kõige rohkem sugukonda Ophiostomataceae kuuluvaid seenpatogeene, mis põhjustavad puidusinetust (Jankowiak jt, 2011). Lisaks on suurtelt-säsiüraskitelt (*Tomicus piniperda*) määratud ohtralt patogeenset seeneliiki *Leptographium wingfieldii*, mis põhjustab samuti puidu värvuse muutust sinakaks ning kahjustab väärtuslikku tööstuspuitu (Solheim jt, 2001).

Okaspuutaimede patogeenid

Käesolevas töös identifitseeriti puiduproovidest mitmeid tuntud seenpatogeene. Puiduproovidest määrati juure- ja juurekaela mädanikku põhjustavat külmaseent (*Armillaria* sp.) ja juurepessu (*Heterobasidion* spp.), puidusinetuse tekitajaid *Ceratocystis* sp., *Ophiostoma* sp., *Pesotum* sp., puude haavandite ja vähktõvede tekitajat *Neonectria* sp. ja teisi taimede patogeene *Peniophora limitata*, *Phoma herbarum*, *Phaeoacremonium hungaricum* ja *Pyrenochaeta cava*. Mitmed mainitud seenpatogeenid põhjustavad majanduslikult suurt kahju, eriti puidutööstusele. Juurepess (*Heterobasidion* spp.) on üks olulisem metsamajanduslikku kahju tekitav seenpatogeen, kes põhjustab puudele ohtlikku juure- või juurekaela mädanikku. Juurepess on levinud rohkem põhjapoolsetes mõõdukama kliimaga piirkondades (Woodward jt, 1998). Juurepess nakatab enamasti raiete järgselt kände, mis juurekontaktide kaudu nakatavad ka ümbritsevaid terveid puid. Okaspuud võivad nakatuda eostega ka tüve vigastuste kaudu (Redfern ja Stenlid, 1998). Käesolevas töös määrati juurepessu (*Heterobasidion* spp.) ainult okaspuukändudelt. Teised olulised puittaimede seenpatogeenid on külmaseened (*Armillaria* sp.), kes põhjustavad samuti juuremädanikku, kuid lisaks okaspuudele võivad nad parasiteerida ka teisel puittaimedel. Raiesmikelt võib neid leida rohkem surnud puudelt ja kändudelt. Juurekontaktide kaudu võivad nad nakatada ka lähedal asuvaid puittaimi, aga ka looduslikult uuenenud ja istutatud okaspuutaimi. Samuti tekitavad need parasiitsed seened suurt majanduslikku kahju, eriti puidutööstusele (Keca ja Solheim, 2011).

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö tulemusena määrati seente ribosomaalsete DNA (ITS2) järjestuste alusel kahjurputukate poolt levitatavaid seenpatogeene, kasutades määramisel kaasaegseid molekulaarseid meetodeid. Seente DNA-d eraldati nii harilike männikärsakate, väike-männikärsakate, männi-juureüraskite, suur- saareüraski ja väike-saareüraski sisikonnast ja kehakatetelt. Putukkahjurite poolt levitatavaid seenekooslusi võrreldi kahjustatud ja terve koorega hariliku männi ja hariliku kuuse taimeproovidega.

Uuringu tulemusena saadi proovidest >18 miljonit DNA järjestust, millest ~7 miljonit sisaldas korrektset ITS2 järjestust. Proovidest saadud ITS2 järjestused klasterdusid 13 517 taksoniks, millest proovides leiduvatele seentele kuulusid ~3,4 miljonit (49%) ITS2 järjestust ja 2227 taksonit (17 %). Kuna töökäigus õnnestus edukalt sekveneerida ~400 aluspaari pikkuseid DNA lõike, siis võib järeldada, et putukkahjuritel leiduv seente geneetiline materjal oli intaktne. See näitab ka seda, et seente eosed nii kehakatetel kui ka sisikonnas on putukatel elujõulised. Töö näitas, et putukkahjurid kannavad oma kehakatetel ja sisikonnas märkmisväärselt palju seentaksoneid, millest mitmed on potentsiaalsed patogeenid, osad kiire kasvuga saprotroofid ning osa endofüüdid. Töö tulemusena selgus, et harilike männikärsakate ja väike-männikärsakate proovides leiduvad seentaksonid olid ligi 28% ulatuses kattuvad, kelle hulgas leidis ka tuntud seenpatogeene. Samuti ei leitud kahe männikärsaka liigi vahel statistilisi erinevusi seentaksonite osas, mis näitab, et sarnase bioloogiaga isendite poolt kantavad seenekooslused suures osas sarnased.

Töö käigus määrati männikärsakate proovidest ja sarnaselt üraseklaste proovidest puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene *Ceratocystis* sp. ja *Ophiostoma* sp. ja puittaimede vähktõve tekitajat *Neonectria* sp. ja taimede seenpatogeeni *Phoma herbarium*. Üraseklaste proovidest määrati teada-tuntud juuremädanikku põhjustavaid külmaseeni (*Armillaria* sp.) ja juurepessu (*Heterobasidion* spp.), puidusinetust põhjustavate seente rühma kuuluvaid seenpatogeene *Pesotum* sp., *Ceratocystis* sp. ja *Ophiostoma* sp ning taimede seenpatogeene *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* ja *Phaeoacremonium hungaricum*.

Männikärsakate proovidest identifitseeritud seenpatogeenidest esinesid koorekahjustusega taimeproovidel seeneliigid *Neonectria* sp. ja *Phoma herbarium*, mida leidis ka tervetel taimeproovidel, mistõttu need seenpatogeenid võivad okaspuutaimedel esineda ka endofüütidena. Seega tervetes ja kahjustusega taimeproovides leiduvad seenpatogeenid olid

suures osas kattuvad. Puidusinetust põhjustavaid seenpatogeene koorekahjustusega taimeproovidest ei määratud, ent neid määrati siiski okaspuukändudelt. Samuti määrati juurepessu (*Heterobasidion* spp.) ainult kannuproovidest. Kuigi käesolev töö näitas, et männikärsakate kehakatetel ja sisikonnas leidub erinevaid seenpatogeene, ent looduslikule ja istutatud metsauuendusele need edasi ei levinud. Siiski leiti käesolevas töös, et kahjustatud koorega okaspuutaimed on kahjustuste tõttu vastuvõtlikumad külmaseentele (*Armillaria* sp.), kes põhjustavad hiljem taimede hukkumist. Seega näitasid tulemused, et okaspuutaimed hukkuvad lisaks männikärsakate kahjustustele ka seennakkuse tagajärjel, kuid männikärsakad selle seennakkuse levitamisel oluliseks vektoriks ei olnud, ent seente levikuks on ka teisi võimalusi.

Pathogenic fungi spreaded by dangerous forest plantation pests

SUMMARY

As a result of current thesis many known pathogenic, saprotrophic and endophytic fungi spreaded by dangerous plantation feeding pests were identified. Fungi were identified from the samples of conifers and herbivorous insects like weevils (*Hylobius* sp.) and beetles (*Scolydinae* sp.) using rDNA ITS2 region, which is universal barcode for fungi. Fungal DNA from weevils were analysed and compared with conifers (damaged plants, healthy plants and conifer stumps). Samples were collected from Southern part of Estonia (Tartumaa, Viljandimaa, Võrumaa). Fungal sequence structure was determined by Illumina MiSeq (San Diego, California, USA) sequencing platform. Sequences were analysed and identified using modern bioinformatical methods developed for Illumina sequencing platform.

As a result of sequencing total >18 million raw reads were generated from collected samples. After bioinformatical analyses only ~7 million sequences considered correct ITS2 sequences by ITSx (Nilsson et al. 2010). After sequence clustering to taxonomical operational units (OTU), total 13 517 OTU-s were found, but only 2227 (17%) OTU-s and ~3,4 (49%) million sequences belonged to fungi originated from samples.

Fungal ITS2 sequences revealed that pine weevils (*H. abietis*, *H. pinastri*) carried spores of sapstain fungi *Ophiostoma* sp and *Ceratocystis*, but also some known plant pathogens like

Phoma herbarium and *Neonectria* sp. It was also examined that fungi associated with beetles (*H. crenatus*, *H. faxini*, *H. brunneus*) belonged to groups of sapstain fungi *Ceratocystis* sp., *Ophiostoma* sp., and *Pesotum* sp., root rot pathogens *Armillaria* sp., *Heterobasidion* spp. and plant pathogens *Peniophora limitata*, *Pyrenochaeta cava* ja *Phaeoacremonium hungaricum*. Results from the plant samples showed that fungal species were overlapping between healthy and damaged plants. Healthy and damaged plants showed only few differences in composition of fungal pathogens. Some of the damaged plants were infected with root rot disease causing pathogen like Honey fungus (*Armillaria* sp.). Only conifer stumps showed infection with sapstain fungi *Ophiostoma* sp. and root rot pathogen *Heterobasidion* spp. Fungal analyses of weevils revealed that they were not an important vector for pathogenic fungi to damaged plants, but injuries can generate stress, which makes plants more sensitive to root rot pathogens like Honey fungus (*Armillaria* sp.), that are always lethal to plants after infection. This can also be one possibility why planted and naturally renewed conifers in the clear cut area perish, but the current work showed that none of the weevils carried fungal spores of Honey fungus.

TÄNUAVALDUS

Lõputöö kirjutamisel olid olulised juhendajate Leho Tedersoo, Rein Drenkhani ja Ivar Sibula nõuanded ja soovitusel. Bioinformaatilise töötuse osas olid tähtsad ka Sten Anslani ja Mohhamad Bahrami soovitusel. Samuti olid olulised ka teiste laborispetsialistide juhatused. Käesolev magistritöö valmis Riigimetsa Majandamise Keskuse metsakaitse uurimisprojekti nr. 8-2/T12115MIMK (2012–2015) toel.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Larsson, K., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Klaus Høiland, Kjøller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.S.F., Tedersoo, L., Ursing, B.M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., Kõljalg, U. 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186: 281–285.

Balint, M., Schmidt, P.-A., Sharma, R., Thines, M., Schmitt, I. 2014. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution* 4: 2642–2653.

Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 99–108.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 189.

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sanchez-Garcia, M., Ebersberger, I., De Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand Y.J.K., Sanli, K., Eriksson, K.M., Vik, U., Veldre, V., Nilsson, R.H. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 914–919.

Bensson, D.A., Clark, K., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers E.W. 2015. GenBank. *Nucleic Acids Research* 43(Database issue): D30–D35.

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Kirk, P.M., Kauserud, H. 2013. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2): 218–224.

Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438.

Brown, P.B., Veach, A.M., Rigdon-Hussb, A.R., Gronda, K., Lickteiga, S.K., Lothamera, K., Olivera, A.K., Jumpponen, A. 2015. Scraping the bottom of the barrel: are rare highthroughput sequences artifacts? *Fungal Ecology* 3: 221–225.

Brown, S.P., Callahan, M.A., Oliver, A.K., Jumpponen, A. 2013. Deep Ion Torrent sequencing identifies soil fungal community shifts after frequent prescribed fires in a southeastern US forest ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 86: 557–566.

Buchheim, M.A. 2011. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence structure phylogenetics: Towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS One* 6: e16931.

Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytology* 184: 449–456.

Camargo, J.A. 1993. Must dominance increase with number of subordinate species in competitive interactions? *Journal of Theoretical Biology* 161: 537–542.

Cristescu, E.M. 2014. From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 29: 566–571.

Day, K.R., Nordlander, G., Kenis, M., Halldórsson, G. 2004. General biology and life cycles of bark weevils. In: *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. (eds. Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A. Grégoire, J.-C., Evans, H.F.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 331–349.

De Beeck, M.O., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. 2014. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One* 9(6): e97629.

Dillon, A., Ward, A., Downe, D., Griffin, C.T. 2006. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Biological Control* 38: 217–226.

- Dillon, A., Griffin, C. 2008. Controlling the large pine weevil, *Hylobius abietis*, using natural enemies. Coford Connects, Dublin. Silviculture / Management 15.
- Drenkhan, T., Sibul, I., Kasanen, R., Vainio, E. 2013. Viruses of *Heterobasidion parviporum* persist within their fungal host during passage through the alimentary tract of *Hylobius abietis*. Forest Pathology 43(4): 317–323.
- Dyer, E.D.A. 1967. Relation of attack by ambrosia beetle (*Trypodendron lineatum* (Oliv.)) to felling date of spruce in central British Columbia. Bi-monthly Research Notes 23(2): 11.
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460–2461.
- Edgar, R.C., Flyvbjerg, H. 2015. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. Bioinformatics 31(21): 3476–3482.
- Geiser, D.M., Klitch, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Studies in Mycology 59: 1–10.
- Gourov, A.V. 2000. *Hylobius* species (Coleoptera: Curculionidae) from Siberia and distribution patterns of adults feedings in Scots pine stands. Entomologica Fennica 11(1): 57–66.
- Gweon, H.S, Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D.S., Griffiths, R.I., Schonrogge, K. 2015. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. Methods in Ecology and Evolution 6(8): 973–980.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes . Proceedings of the Royal Society London, Series B 270: 313–321.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology 2(10): 1657–1663.
- Hill, T.C., Walsh, K.A., Harris, J.A., Moffett, B.F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology 43(1): 1–11.

Ihrmark, K., Bodeker, I., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82(3): 666–677.

Jacobi, W. R., Koski, R. D., Harrington, T. C., and Witcosky, J. J. 2007. Association of *Ophiostoma novo-ulmi* with *Scolytus schevyrewi* (Scolytidae) in Colorado. *Plant Diseases* 91: 245–247.

Jacobi, W.R, Koski R.D., Negron J.F. 2013. Dutch elm disease pathogen transmission by the banded elm bark beetle *Scolytus schevyrewi*. *Forest Pathology* 43(3): 232–237.

Jacobs, K., Wingfield, M. 2001. *Leptographium* species: tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press.

Jankowiak R. , Kot, M. 2011. Ophiostomatoid fungi associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) colonizing branches of *Pinus sylvestris* in southern Poland. *Polish Botanical Journal* 56(2): 287–293.

Jankowiak, R., Bilanski, P. 2013. Association of the pine-infesting *Pissodes* species with ophiostomatoid fungi in Poland. *European Journal of Forest Research* 132(3): 523–534.

Jankowiak, R., Bilanski, P. 2013. Diversity of ophiostomatoid fungi associated with the largepine weevil, *Hylobius abietis*, and infested Scots pine seedlings in Poland. *Annals of Forest Science* 70(4): 391–402.

Keca, N., Solheim, H. 2011. Ecology and distribution of *Armillaria* species in Norway. *Forest Pathology* 41(2): 120–132.

Koch, H., Abrol, D.P., Li, J., Schmid-Hempel, P. 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology* 22: 2028–2044.

Kress, W.-J., Erickson, D.L. 2008. DNA Barcoding – a Windfall for Tropical Biology. *Biotropica*, 40(4): 405–408.

Kõljalg, U., Larsson, K-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F., Tedersoo, L., Vrålstad, T., Ursing, B.M. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063–1068.

Leather, S.R., Day, K.R., Salisbury, A.N. 1999. The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera:Curculionidae): a problem of dispersal? *Bulletin of Entomological Research* 89(1): 3–16.

Lee, S., Hamelin, R.C., Six, D.L., Breuil, C. (2007). Genetic diversity and the presence of two distinct groups in *Ophiostoma clavigerum* associated with *Dendroctonus ponderosae* in British Columbia and the Northern Rocky mountains. *Phytopathology* 97: 1179–1185.

Li, D.-Z. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19641–19646.

Li, W., Godzik, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22(13): 1658–1659.

Lim, Y.W., Massoumi Alamouti, S., Kim, J.J., Lee, S., Breuil, C. 2004. Multigene phylogenies of *Ophiostoma clavigerum* and closely related species from bark beetle-attacked *Pinus* in North America. *FEMS Microbiology Letters* 237: 89e96.

Lindelöw, A., Eidmann, H.H., Nordenhem, H. 1993. Response on the ground of bark beetle and weevil species colonizing conifer stumps and roots to terpenes and ethanol. *Journal of Chemical Ecology* 19(7): 1393–1403.

Masella, A., Bartram, A., Truszkowski, J., Brown, D., Neufeld, J. 2012. PANDAseq: paired-end assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13: 31.

Nilsson, R.H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K-H, Kõljalg, U. 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1(1): e59.

- Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseherd, M., Amende, A., Bergsten, J., Kristiansson, E., Ryberg, M., Jumpponen, A., Abarenkov, K. 2010. An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS 47 sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology* (4): 284–287.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K.-H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Bioinformatics* 4: 193–201.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* 296: 97–101.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.P., Jackson, J.A., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9) 5544–5550.
- Piou, D. 1993. Role d'*Hylobius abietis* (L.) (Col, Curculionidae) dans le transport de *Leptographium* (Kendr) Wingf et son inoculation au pin sylvestre. *Annales des Sciences Forestières* 50: 297–308.
- Plattner, A., DiGuistini, S., Breuil, C. 2008. Variation in pathogenicity of a mountain pine beetle-associated blue-stain fungus, *Grosmannia clavigera*, on young lodgepole pine in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30(3): 457–466.
- Porras-Alfaro, A., Liu, K.-L., Kuske, C.R., Xie, G. 2014. From Genus to Phylum: Large-Subunit and Internal Transcribed Spacer rRNA Operon Regions Show Similar Classification Accuracies Influenced by Database Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 80(3): 829–840.
- Redfern, D.B., Stenlid, J. 1998. Spread within the tree and stand. In: *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control (eds. Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A.). CAB International, Wallingford, UK. p. 125–141.

- Rice, AV., Langor, DW. 2009. Mountain pine beetle-associated blue-stain fungi in lodgepole jack pine hybrids near Grande Prairie, Alberta (Canada). *Forest Pathology* 39: 323–334.
- Robideau, GP. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11: 1002–1011.
- Romón, P., Zhou, X.D., Iturrondobeitia, J.C., Wingfield, M.J., Goldarazena, A. 2007. *Ophiostoma* species (Ascomycetes:Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Microbiology* 53(6): 756–767.
- Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 11: 3–11.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 17: 363–365.
- Schmidt, P.-A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J., Schmitt, I. 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65: 128–132.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A, Huhndorf, S., Robert, V., Spougea, J.L., Levesque, A., Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*.
- Schroeder, L.M. 1988. Attraction of the bark beetle *Tomicus piniperda* and some other bark- and wood-living beetles to the host volatiles alpha-pinene and ethanol. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 46: 203–210.
- Sibul, I. 2014. Männikärsakad – metsauuenduse olulisimad kahjurid. *Metsamajandus [ajalehe Äripäev lisa]* 4(8): 26–30.
- Sibul, I. 2015. Kaitsevahad männikärsaka vastu. *Eesti Mets* 4: 38–43.
- Sibul, I. ja Voolma, K. 2006. The effects of collecting fluid on the catch results of *Hylobius abietis* in pitfall traps. *Agronomy Research* 4: 457–460.

Sibul, I., Ploomi, A., Voolma, K. 2009. Influence of neem oil on the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae). *Baltic Forestry* 15(2): 255–261.

Sibul, I., Voolma, K., Luik, A., Ploomi, A. 2002. Influence of some natural insecticides on the feeding activity of large pine weevil, *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). Plant protection in the Baltic Region in the context of integration to EU. Proceedings of the Scientific International Conference, Kaunas, Akademija, Lithuania, September 26–27, 2002, 107–110.

Six, D.L. 2003. Bark Beetle-Fungus Symbioses. pp. 99–116. In: *Insect Symbiosis*. (eds. Bourtzis, K., Miller, T.A.) CRC Press.

Solheim, H., Krokene, P. 1998. Assessing the virulence of four bark beetle-associated bluestain fungi using Norway spruce seedlings. *Plant Pathology* 47(4): 537–540.

Solheim, H., Krokene, P. 1998. Growth and virulence of mountain pine beetle associated blue-stain fungi, *Ophiostoma clavigerum* and *Ophiostoma montium*. *Canadian Journal of Botany*, 76: 561–566.

Solheim, H., Krokene, P., Långström, B. 2001. Effects of growth and virulence of associated blue-stain fungi on the host colonisation behaviour of pine shoot beetles *Tomicus minor* and *T. piniperda*. *Plant Pathology* 50: 111–116.

Zhou, X.D., de Beer, Z.W., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 2001. *Ophiostomatoid* fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53: 290–300.

Zipfel, R.D., de Beer, Z.W., Jacobs, K., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55: 75–97.

Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., Abarenkov, K. 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys* 10: 1–43.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., jt. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346(6213): 1256688-1–1256688-10.

- Tsui, C.K.M., Wang, B., Khadempour, L., Alamouti, SM., Bohlmann, J., Murray, BW., Hamelin, RC. 2010. Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountainpine beetles by padlock probes. *Journal of Microbiological Methods* 83(1): 26–33.
- Weizhong L., Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* (22): 1658–1659.
- Whitehill, JG., Lehman, JS., Bonello, P. 2007. *Ips pini* (Curculionidae: Scolytinae) is a vector of the fungal pathogen, *Sphaeropsis sapinea* (Coelomycetes), to Austrian pines, *Pinus nigra* (Pinaceae). *Environmental Entomology* 36(1): 114–20.
- Viiri, H. 2004. Fungi associated with *Hylobius abietis* and other weevils. In: Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis (eds. Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F.), pp. 381–393. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Vilgalys, R., Hester, M. 1990. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. *Journal of Bacteriology* 172(8): 4238–4246.
- Wingfield, MJ, Gibbs, JN. 1991. *Leptographium* and *Graphium* species associated with pine-infesting bark beetles in England. *Mycological Research* 95: 1257–1260
- Wingfield, M.J., van Wyk, P.S. 1993. A new species of *Ophiostoma* from *Protea* infructescences in South Africa. *Mycological Research* 97: 709–716.
- Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. 1998. *Heterobasidion annosum*. Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International, Wallingford, UK.
- Voolma, K. 2002. Vaid osa üraseaduses on metsakahjurid. *Eesti Loodus* 5: 16–19.
- Voolma, K. 2003. Okaspuukultuure ähvardab männikärsakas. *Eesti mets* 1.
- Voolma, K. 2004. Puidu- ja säsiüraskid – metsamehe kevadekuulutajad. *Eesti Mets* 1: 37–39.

Voolma, K., Süda, I., Õunap, H. 1997. Eesti ürasklaste (Coleoptera, Scolytidae) määraja. Tartu, 43 lk.

Õunap, H. 1996. Saareüraskitest (*Hylesinus*) ja kääbusüraskitest (*Crypturgus*) (Coleoptera, Scolytidae) Eestis. Metsanduslikud Uurimused 27: 133–139.

LISAD

1. Järjestuste eeltöötlemiseks kasutatud protseduurid (Pretreatment_script-autor S.Anslan).

```
#!/bin/bash
```

```
echo "Renaming R1 and R2 seq headers for mothur"
```

```
tr " " "Ã" < R1.fastq >R1r.fastq && mothur "#fastq.info(fastq=R1r.fastq)" && rm R1r.fastq
```

```
tr " " "Ã" < R2.fastq >R2r.fastq && mothur "#fastq.info(fastq=R2r.fastq)" && rm R2r.fastq
```

```
echo "Starting mothur trimming of R1 and R2"
```

```
mothur "#trim.seqs(fasta=R1r.fasta, maxambig=0, qfile=R1r.qual, qwindowaverage=28,  
qwindowsize=15, processors=4, minlength=150)" && python  
Fasta_and_qual_to_FASTQ_R1.txt && rm R1r.scrap.fasta && rm R1r.scrap.qual
```

```
mothur "#trim.seqs(fasta=R2r.fasta, maxambig=0, qfile=R2r.qual, qwindowaverage=28,  
qwindowsize=15, processors=4, minlength=150)" && python  
Fasta_and_qual_to_FASTQ_R2.txt && rm R2r.scrap.fasta && rm R2r.scrap.qual
```

```
echo "renaming R1 and R2 back to original names so that Pandaseq can work and python  
sorting out only paired R1 and R2 sequences (singles into separate fastq)"
```

```
tr "Ã" " " < R1r.trim.fastq > R1r.trim_x.fastq && tr "_" ":" < R1r.trim_x.fastq >
R1r.trim.fastq_nameOK.fastq && rm R1r.trim_x.fastq
```

```
tr "Ã" " " < R2r.trim.fastq > R2r.trim_x.fastq && tr "_" ":" < R2r.trim_x.fastq >
R2r.trim.fastq_nameOK.fastq && rm R2r.trim_x.fastq && python
fastqCombinePairedEnd.txt R1r.trim.fastq_nameOK.fastq R2r.trim.fastq_nameOK.fastq
```

```
echo "Sorting R1 and R2 sequences to match and assembling"
```

```
cat R1r.trim.fastq_nameOK.fastq_pairs_R1.fastq | paste - - - | sort -k1,1 -t " " | tr "\t" "\n" >
R1.trim_pairs_sorted_to_Pandaseq.fastq
```

```
cat R2r.trim.fastq_nameOK.fastq_pairs_R2.fastq | paste - - - | sort -k1,1 -t " " | tr "\t" "\n" >
R2.trim_pairs_sorted_to_Pandaseq.fastq &&
```

```
echo "Starting to assemble sequences with PandaSeq" &&
```

```
pandaseq -f R1.trim_pairs_sorted_to_Pandaseq.fastq -r
R2.trim_pairs_sorted_to_Pandaseq.fastq -F -N -T 8 -B -o 15 > PANDA_o15.fastq
```

```
echo "Assembling done"
```

```
#Rename sequence headers
```

```
echo "..."
```

```
echo "Renaming sequence headers to numbers from 1 to ..."
```

```
fastx_renamer -n COUNT -Q33 -i PANDA_o15.fastq -o PANDA_o15_renamed.fastq
```

```
echo "Renaming done, output -> PANDA_o15_renamed.fastq"
```

```
./mothur "#fastq.info(fastq=PANDA_o15_renamed.fastq)"
```

2. Töös kasutatud identifitseerimispraimerite järjestused.

| Identifitseerimisjärjestus | ITS4 praimerite järjestus | Proovi nimetus | Prooviliik |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| ATATGATACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.V1 | Väike männikärsakas |
| ATCACTCATAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.V2 | Väike männikärsakas |
| ATCATCGAGTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K1.H | Harilik männikärsakas |
| ATCGAGCTCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Erakogu.3H | Harilik männikärsakas |
| ATCGCAGACAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT019.3H | Harilik männikärsakas |
| ATCTGTCTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K2.V | Väike männikärsakas |
| ATGAGTGACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K3.H | Harilik männikärsakas |
| ATGATGTGTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.2H | Harilik männikärsakas |
| ATGCTATAGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT014.1V | Väike männikärsakas |
| ATGCTCGCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.3V | Väike männikärsakas |
| ACGTGCAGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K2.H | Harilik männikärsakas |
| ACTCACAGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.1H | Harilik männikärsakas |
| AGACTCAGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Erakogu.1.H | Harilik männikärsakas |
| AGAGAGTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.2V | Väike männikärsakas |
| AGCTATCGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Erakogu.1V | Väike männikärsakas |
| AGTCTGACTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.1H | Harilik männikärsakas |
| AGTGAGCTCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.3H | Harilik männikärsakas |
| ATAGCTCTCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.3H | Harilik männikärsakas |
| ATCACGTGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Erakogu.2H | Harilik männikärsakas |
| ATCGTAGCAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.2H | Harilik männikärsakas |
| ATCGTCTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.3V | Väike männikärsakas |
| ATGTGTCTAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.1H | Harilik männikärsakas |
| ACACTCGCACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.1V | Väike männikärsakas |
| ACAGACGTCTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.V2 | Väike männikärsakas |
| ACGACAGCGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K.3V | Väike männikärsakas |
| ACGATCTGTCTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.3V | Väike männikärsakas |
| ACGTGATGACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.2H | Harilik männikärsakas |
| ACTATGTACAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | K.1V | Väike männikärsakas |
| ACTCGATATAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Negatiivne kontroll | Kontrollproov |
| ACTCGCACGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Positiivne kontroll Mix22 | Kontrollproov |
| ACTAGCAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0516 | Kännuproov |
| AGTATACATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0517 | Kännuproov |
| AGTCGAGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0518 | Kännuproov |
| AGTGCTACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0519 | Kännuproov |
| ACGATCGTATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0520 | Kännuproov |
| ACGCAGTACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0521 | Kännuproov |
| ACGCGTATACA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0664 | Kännuproov |
| ACGTACAGTCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0665 | Kännuproov |
| ACGTACTCAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0666 | Kännuproov |
| ACTATAGCGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0667 | Kännuproov |
| ATACGTCATCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0668 | Kännuproov |
| ATAGTCGCATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0669 | Kännuproov |

| | | | |
|-------------|----------------------|------------------|-------------------------|
| ATATGCTAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0670 | Kännuproov |
| ATCACGCGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0671 | Kännuproov |
| ATCGATAGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0672 | Kännuproov |
| ATCGCTGCGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | RD0673 | Kännuproov |
| ATCTGACGTCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A1 | Harilik männikärsakas |
| ATGAGTCAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A2 | Harilik männikärsakas |
| ATGTAGTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A3 | Harilik männikärsakas |
| ATGTCACACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A4 | Harilik männikärsakas |
| ATGTCGTCGCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A5 | Harilik männikärsakas |
| ACACATACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A6 | Harilik männikärsakas |
| ACGACAGCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A7 | Harilik männikärsakas |
| ACGTCTCATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A8 | Harilik männikärsakas |
| ACTCATCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_A9 | Harilik männikärsakas |
| ACTCGCGCAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B1 | Männi-juureürask |
| AGAGCGTCAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B2 | Männi-juureürask |
| AGCGACTAGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B3 | Männi-juureürask |
| AGTAGTGATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B4 | Männi-juureürask |
| AGTGACACAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B5 | Männi-juureürask |
| AGTGTATGTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B6 | Männi-juureürask |
| ATAGATAGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B7 | Männi-juureürask |
| ATATAGTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_B8 | Männi-juureürask |
| ATCTACTGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P1 | Väike männikärsakas |
| ACACGTAGATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P2 | Väike männikärsakas |
| ACACGTGTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P3 | Väike männikärsakas |
| ACATACTCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P4 | Väike männikärsakas |
| ACGACACTATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P5 | Väike männikärsakas |
| ACGAGACGCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P6 | Väike männikärsakas |
| ACGTATGCGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P7 | Väike männikärsakas |
| ACGTCGATCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P8 | Väike männikärsakas |
| ACTAGTCACTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | TD_P9 | Väike männikärsakas |
| ACTAGCAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTATACATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTCGAGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTGCTACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGATCGTATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGCAGTACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGCGTATACA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ACGTACAGTCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ACGTACTCAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.MA.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ACTATAGCGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ATACGTCATCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ATAGTCGCATA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.019.KU.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ATATGCTAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ATCACGCGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ATCGATAGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ATCGCTGCGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.K1 | Kahjustusega taimeproov |

| | | | |
|-------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| ATCTGACGTCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGAGTCAGTA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGTAGTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ATGTCACACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ATGTCGTCGCA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.MA.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ACACATACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ACGACAGCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ACGTCTCATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.017.KU.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ACTCATCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ACTCGCGCAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| AGAGCGTCAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| AGCGACTAGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTAGTGATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTGACACAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| AGTGTATGTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ATAGATAGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ATATAGTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.MA.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ATCTACTGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ACACGTAGATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ACACGTGTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | QT.014.KU.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ACATACTCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.MA.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGACACTATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.MA.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGAGACGCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.MA.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGTATGCGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGTCGATCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ACTAGTCACTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ACTCTACGCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Negatiivne kontroll | Kontrollproov |
| ACTGTACATAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Positiivne kontroll Mix22 | Kontrollproov |
| ATAGACTGCAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.MA.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ATAGCTCTATC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.219.MA.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ATATGATACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.MA.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ATCACTCATAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.TERV.1 | Terve taimeproov |
| ATCATCGAGTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.TERV.2 | Terve taimeproov |
| ATCGAGCTCTC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | KS.218.KU.TERV.3 | Terve taimeproov |
| ATCGCAGACAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ATCTGTCTCGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGAGTGACGC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGATGTGTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.K1 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGCTATAGAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.K2 | Kahjustusega taimeproov |
| ATGCTCGCTAC | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.K3 | Kahjustusega taimeproov |
| ACGTGCAGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.Terv.1 | Terve taimeproov |
| ACTCACAGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.Terv.2 | Terve taimeproov |
| AGACTCAGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.MA.Terv.3 | Terve taimeproov |
| AGAGAGTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.Terv.1 | Terve taimeproov |
| AGCTATCGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.Terv.2 | Terve taimeproov |
| AGTCTGACTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Ränna.võrumaa.KU.Terv.3 | Terve taimeproov |

| | | | |
|---------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|
| AGTGAGCTCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3168.väike.saare.ürask.tartumaa | Saareürask |
| ATAGCTCTCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3169.väike.saare.ürask.tartumaa | Saareürask |
| ATCACGTGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3170.väike.saare.ürask.tartumaa | Saareürask |
| ATCGTAGCAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3171.väike.saare.ürask.tartumaa | Saareürask |
| ATCGTCTGTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3181.väike.saare.ürask.viljandimaa | Saareürask |
| ATGTGTCTAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3182.väike.saareürask.viljandimaa | Saareürask |
| ACACTCGCACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3183.väike.saareürask.viljandimaa | Saareürask |
| ACAGACGTCTGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3184.väike.saareürask.viljandimaa | Saareürask |
| ACGACAGCGAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3081.suur.saareürask.järvselja | Saareürask |
| ACGATCTGTCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3082.suur.saareürask.järvselja | Saareürask |
| ACGTGATGACGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3083.suur.saareürask.järvselja | Saareürask |
| ACTATGTACAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | 3084.suur.saareürask.järvselja | Saareürask |
| ACTCGATATAGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Negatiivne kontroll | Kontrollproov |
| ACTCGCACGCGA | TCCTSCGCTTATTGATATGC | Positiivne kontroll Mix22 | Kontrollproov |

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina

Riho Remmelgas

(autori nimi)

(sünnikuupäev:

22.05.1987)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Metsakultuuride kahjurputukad kui seenpatogeenide levitajad

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Leho Tedersoo ja Rein Drenkhan

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.16 *(kuupäev)*

